

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctor en Ciencias Biológicas

**Desarrollo de sistemas de diagnóstico para
la hormona estimulante de tiroides (TSH) en
suero humano: ELISA e Inmuno-PCR
cuantitativa (qI-PCR)**

Lic. Julián E. Abud

Director de Tesis: Dr. Rodríguez, Horacio A.

Co-director de Tesis: Dr. Luque, Enrique H.

*Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral
(ISAL, UNL - CONICET)*

-2017-



I S A L

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones cuyo esfuerzo y sacrificio han hecho posible este logro, el cual no es mío, sino de ellos en realidad.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por haber hecho posible la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindarme los medios para finalizar este trabajo de tesis.

Al Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) de la FBCB-UNL y a Zelltek S.A. por facilitarme tanto reactivos biológicos como la utilización de equipos de microscopía.

A los laboratorios de análisis bioquímicos, a los profesionales de la salud y a todos los voluntarios a través de los cuales se obtuvieron muestras biológicas.

Al Dr. Horacio Rodríguez, por su paternal tutoría y guía permanente. Por ser, además de un gran director, una gran persona.

Al director del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Dr. Enrique Luque, por codirigir esta tesis y permitirme compartir estos años con tan excelente grupo de trabajo.

A todos los compañeros/as del ISAL, a los que están y a los que han pasado. A esos nuevos “viejos amigos” con los que en estos años he compartido muy gratos momentos, penas, alegrías e ilusiones.

Un agradecimiento muy especial merece el cariño y el apoyo indispensable de mis familiares y amigos. Muy particularmente a mis padres, Alberto e Irene.

El agradecimiento final lo reservé para Ro, que es mi motivación y fortaleza. Por darme tanto amor y felicidad, porque vivimos intensamente y disfrutamos juntos de cada momento de la vida. Porque a poco de empezar este desafío tuvimos la fortuna y alegría incomparable de ser padres.

Especialmente dedicado a Felipe.
Fruto de nuestro amor, dueño de nuestra felicidad.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- **Abud, J.E.**, Santamaria C.G., Luque H.E., Rodriguez H.A. *“Development of quantitative immuno-polymerase chain reaction assay to detect and quantify human thyroid stimulating hormone”*. Analytical Biochemistry 539 (2017) 134–143 (2017).
- **Abud J.E.**, Luque E.H., Ramos J.G., Rodríguez H.A. *“Production of monoclonal antibodies and development of a quantitative immuno-polymerase chain reaction assay to detect and quantify recombinant Glutathione S-transferase”*. Protein Expression and Purification 135, 16-23 (2017).
- C.G. Santamaría, H.A. Rodriguez, **J.E. Abud**, O.E. Rivera, M. Muñoz de Toro, E.H. Luque. *“Impaired ovarian response to exogenous gonadotropins in female ratoffspring born to mothers perinatally exposed to Bisphenol A”*. Reproductive Toxicology 73, 259-268 (2017).

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	2
<i>Publicaciones Científicas</i>	4
<i>Índice</i>	5
<i>Abreviaturas y Símbolos</i>	10
<i>Unidades</i>	13
<i>Resumen</i>	14
<i>Abstract</i>	16
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	18
1. Aspectos básicos de fisiología endocrina	19
2. Glándula tiroides y hormonas tiroideas	22
2.1. Síntesis y secreción de T₃ y T₄	24
2.2. Funciones fisiológicas de las hormonas tiroideas	28
2.3. Regulación de la secreción de las hormonas tiroideas	30
2.4. Fisiopatología de las hormonas tiroideas	31
2.4.1. Hipertiroidismo	32
2.4.2. Hipotiroidismo	33
3. Metodologías para la determinación de alteraciones endocrinas	34
3.1. Inmunoensayos enzimáticos	35
3.2. Desarrollo de una nueva metodología	37
3.3. Generalidades de la técnica de IPCR	39
4. Desarrollos y estrategias más utilizadas en IPCR	40
4.1. Conjugación covalente de sondas de ADN y anticuerpos	41
4.2. Nanopartículas funcionalizadas	42
4.3. Nanobioestructuras	45
5. Aplicaciones de la técnica de IPCR	48

CAPÍTULO II: OBJETIVOS DEL TRABAJO DE TESIS.....	50
1. Objetivo General.....	51
2. Objetivos Específicos	51
CAPÍTULO III: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-TSH	52
1. Introducción	53
1.1. Producción de anticuerpos monoclonales (MAbs)	53
1.2. Familia de hormonas glicoproteicas	55
1.2.1. Estructura de las hormonas glicoproteicas	55
1.2.2. Características de la fracción proteica de las HGP	56
1.2.3. Características de la fracción oligosacárida de las HGP	57
1.3. Hormona estimulante de tiroides humana (hTSH)	57
2. Objetivos	59
3. Materiales y Métodos.....	60
3.1. Antígenos hormonales.....	60
3.2. Línea celular de mieloma.....	60
3.3. Medios de cultivo para hibridomas	60
3.4. Mantenimiento de los cultivos de hibridomas	61
3.5. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales	61
3.6. Criopreservación de células de mamíferos	62
3.7. Revitalización de células de mamíferos	62
3.8. Obtención de hibridomas productores de MAbs anti-hTSH	63
3.9. Determinación de la especificidad de los MAbs por ELISA Indirecto.....	67
3.10. Producción <i>in vitro</i> y purificación de MAbs anti-hTSH seleccionados.....	68
3.10.1 Purificación de MAbs por cromatografía de afinidad a proteína G.....	68
3.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	69
3.11. Caracterización inmunoquímica.....	70

3.12.	Estimación de la constante de afinidad (K_{aff}) aparente.....	71
3.13.	Acoplamiento de MAb's a biotina.....	73
3.14.	Estudio de MAb's aptos para el desarrollo de inmunoensayos tipo <i>sandwich</i>	75
3.15.	Evaluación de la especificidad de los pares de MAb's	76
4.	Resultados y Discusión	78
4.1.	Evaluación de la respuesta inmune frente a hTSH	78
4.2.	Fusión celular y obtención de clones productores de MAb's específicos.....	78
4.3.	Obtención de clones específicos y determinación de la especificidad	79
4.4.	Selección y purificación de MAb's anti-hTSH.....	81
4.5.	Caracterización inmunoquímica y Estimación de K_{aff} aparente	83
4.6.	Evaluación de MAb's biotinilados	87
4.7.	Desarrollo de ensayos de ELISA <i>sandwich</i> anti-hTSH	88
4.8.	Especificidad de los pares de MAb's.....	90

CAPÍTULO IV: DESARROLLO DE UN ELISA <i>SANDWICH</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE TSH EN SUERO HUMANO		94
1.	Introducción	95
1.1.	Variaciones fisiológicas de TSH en suero humano	95
1.2.	Cuantificación de TSH en suero humano.....	97
2.	Objetivos	100
3.	Materiales y Métodos	101
3.1.	Estudio de matrices para la producción de estándares de calibrado.....	101
3.2.	Detección de hTSH en bajas concentraciones.....	101
3.3.	Evaluación de los prototipos de ELISA <i>sandwich</i> en <i>pools</i> de suero humano ..	102
3.4.	Optimización de las condiciones de ensayos de los prototipos B-4 y B-9	103
3.5.	Evaluación de los prototipos de ELISA <i>sandwich</i> con estándares comerciales..	104
3.6.	Western blot	105
3.7.	Determinación de los parámetros funcionales de los prototipos B-4 y B-9	106

4. Resultados y Discusión	107
4.1. Estudio de matrices para la producción de estándares de calibrado.....	107
4.2. Capacidad de detección de bajas concentraciones de hTSH	108
4.3. Capacidad de detección en <i>pooles</i> de suero humano	108
4.4. Optimización de las condiciones de ensayos de los prototipos B-4 y B-9	110
4.7. Evaluación de la especificidad en suero humano.....	113
4.8. Parámetros funcionales de los prototipos B-4 y B-9.....	114
CAPÍTULO V: DESARROLLO DE UN ENSAYO DE IPCR <i>SANDWICH</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE TSH EN SUERO HUMANO	115
1. Introducción	116
1.1. IPCR “Universal”	116
1.2. Diseño de sondas de ADN	118
1.3. Generación de señal y métodos de detección	118
1.4. Desafíos.....	120
2. Objetivos	122
3. Materiales y Métodos.....	123
3.1. Diseño de oligonucleótidos para PCR / IPCR.....	123
3.2. Producción de sondas de ADN	124
3.3. Electroforesis en geles de agarosa	125
3.4. Funcionalidad de las sondas de ADN purificadas	125
3.5. Evaluación de oligonucleótidos de detección	125
3.6. Mezcla de reacción de la PCR para ensayos de IPCR	126
3.7. Evaluación de tubos de PCR para ensayos de IPCR	127
3.8. Interacción de complejos ADN-neutravidina con anticuerpos biotinilados	128
3.9. Detección de hTSH por IPCR <i>sandwich</i>	129
3.10. Evaluación del ensayo de IPCR <i>sandwich</i> con estándares comerciales	130
3.11. Evaluación de la especificidad en muestras de suero humano	131

3.12.	Determinación de los parámetros funcionales del ensayo de IPCR.....	131
4.	Resultados y Discusión	132
4.1.	Producción y purificación de sondas de ADN mono y bi-biotiniladas.....	132
4.2.	Funcionalidad de sondas de ADN (purificadas)	133
4.3.	Evaluación de los oligonucleótidos de detección.....	136
4.6.	Mezcla de reacción de PCR para ensayos de IPCR	136
4.5.	Evaluación de tubos de PCR	138
4.6.	Unión del complejo ADN-neutravidina al anticuerpo de detección.....	140
4.7.	Detección de hTSH por IPCR <i>sandwich</i>	143
4.8.	Evaluación del ensayo de IPCR <i>sandwich</i> frente a estándares comerciales	147
4.9.	Evaluación de la especificidad en muestras de suero humano	149
4.10.	Parámetros funcionales de ensayo de IPCR (B-9).....	150
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES		152
1.	Conclusión General.....	153
a)	<i>Innovación en la medición analítica tiroidea</i>	154
b)	<i>Aspectos técnicos de la metodología de IPCR</i>	155
ANEXO		157
1.	Evaluación de los antígenos nativos provistos por el NIDDK.....	158
2.	Obtención de antígenos recombinantes.....	161
3.	Obtención de MAbs por fusiones en medio semisólido.....	174
4.	Evaluación de otros formatos de ELISA <i>sandwich</i>	178
5.	Optimización de ensayos de IPCR.....	187
Bibliografía		194

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

aa	aminoácido
Abs.	absorbancia
ADN / DNA	ácido desoxirribonucleico / <i>desoxyribo-nucleic acid</i>
AC	adenil ciclase
ACTH	hormona adrenocorticotropa
ADH	vasopresina
Ag	antígeno
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
Asn	asparagina
AuNPs	nanopartículas de oro
A-STV	quimera compuesta por proteína A y estreptavidina
BSA	albúmina sérica bovina
CaCl₂	cloruro de calcio
CEDIA	<i>Cloned Enzyme Donor Immunoassay</i>
CHO_K1	células de ovario de hámster chino
CL	cadena liviana de inmunoglobulinas
CN	control negativo
CO₂	dióxido de carbono
CP	cadena pesada de inmunoglobulinas
CRH	hormona liberadora de corticotropina
Ct	<i>Threshold cycle</i>
Ct_(p)	Ct promedio
DAB	diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
DEHAL1	yodotirosina dehalogenasa 1
DIT	diyodotirosina
DL	dilución límite
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DS	desviación estándar
D1/D2	enzimas desyodasas
D-MEN	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EIA	<i>enzyme immunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELOSA	<i>Enzyme-Linked Oligosorbent assay</i>
EMIT	<i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i>
Fc	dominios constantes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas
Fe₃O₄	óxido ferroso
FSH	hormona estimulante del folículo
FT₄	tiroxina libre
GC	cromatografía gaseosa
GFP	proteína verde fluorescente
GH	hormona de crecimiento

GHRH	hormona liberadora de la hormona de crecimiento
GnRH	hormona liberadora de gonadotropina
GST	glutación S-transferasa
HAT	hipoxantina, aminopterina y timidina
hCG	gonadotropina coriónica humana
HCl	ácido clorhídrico
HEK_293	células embrionarias de riñón humano
hFSH	hormona estimulante del folículo humana
HGPRT	hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
HGPs	hormonas glicoproteicas
hLH	hormona luteinizante humana
HPL	lactógeno placentario humano
HPLC	cromatografía líquida de alta performance
HRP	peroxidasa de rábano picante
HT	hipoxantina y timidina
hTSH	hormona estimulante de tiroides humana
H₂O_{dd}	agua destilada y desionizada
H₂SO₄	ácido sulfúrico
Ig	inmunoglobulina
IP	intraperitoneal
IPCR	inmuno-PCR
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
IP3	trifosfato de inositol
KAc	acetato de potasio
K_{aff}	constante de afinidad
KCl	cloruro de potasio
L	leche descremada
LB	Luria Bertani
LD / LOD	límite de detección / <i>limit of detection</i>
LH	hormona luteinizante
LQ	límite de cuantificación
MAb	anticuerpo monoclonal
MAbs	anticuerpos monoclonales
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MIT	monoyodotirosina
MnCl₂	cloruro de manganeso
MNPS	partículas magnéticas
MSH	hormona estimulante de los melanocitos
NIS	transportador simporter de yoduro/sodio
NIDDK	<i>National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases</i>
NS0	línea celular de mieloma murino
ON	toda la noche
OMS / WHO	Organización Mundial de la Salud / <i>World Health Organization</i>
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	solución salina de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEI	polietilenimina

PDS	pendrina
PLC	fosfolipasa C
PM	peso molecular
PTH	hormona paratiroidea
RIA	radio inumnoensayo
r-hFSH	hormona estimulante del folículo humana recombinante
ScFv	regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de anticuerpos
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
Ser	serina
SM	espectrometría de masas
SNC	sistema nervioso central
SRIH	somatostatina
STV	estreptavidina
STV-HRP	conjugado enzimático estreptavidina - peroxidasa de rábano picante
T	Tween 20
TA	temperatura ambiente
TBS	solución salina de tris
TE	solución de Tris-EDTA
Tg	tiroglobulina
Thr	treonina
TMB	3-3'-5-5'- tetrametilbenzidina
TPO	peroxidasa tiroidea
TRH	hormona liberadora de tirotropina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
TSH	hormona estimulante de tiroides o tirotropina
TSHα2	polipéptido correspondiente al exón 2 la cadena β de hTSH
TSHα3	polipéptido correspondiente al exón 3 la cadena β de hTSH
TSHR	receptor de TSH
TSHβ	subunidad β de hTSH
Tween 20	polisorbato 20
T₃	triiodotironina
T₄	tiroxina
V(%)	viabilidad porcentual
V_f	volumen final
X_M	concentración de células no viables
X_T	concentración de células totales
X_V	concentración de células viables
-SH	grupo tiol o sulfhidrilo
-NH₂	grupo amino primario
λ	longitud de onda
Δ	variación
ΔCt	[ciclos totales – Ct muestra]

UNIDADES

% P/V	g/100 ml
% V/V	ml/100 ml
°C	grados Celsius
cm	centímetro
cm²	centímetro cuadrado
μm	micrómetro
g	gramo
g	fuerza de gravedad terrestre
mg	miligramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
pg	picogramo
fg	femtogramo
l	litro
dl	decilitro
ml	mililitro
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
nM	nanomolar
pM	picomolar
nm	nanometro
MΩ	megaohmio
kDa	kilodalton
kpb	kilopares de bases
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
UI	unidades internacionales de actividad biológica
μUI	microunidades internacionales
V	voltios
W	vatios

RESUMEN

La función de la glándula tiroides está regulada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH), una hormona glicoproteica secretada por la hipófisis anterior. Esta hormona comprende un heterodímero formado por las subunidades α y β . Mientras que la subunidad α es idéntica para todas las integrantes de la familia de hormonas glicoproteicas (hormona luteinizante, hormona folículo estimulante y gonadotrofina coriónica humana), la subunidad β es única y es la que les confiere actividad biológica específica. En el caso de TSH, la transcripción génica de ambas subunidades es inducida por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) producida por el hipotálamo. En respuesta principalmente a TRH, la TSH madura se libera a la circulación e induce la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas: triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), que son las hormonas metabólicamente activas. La secreción de TSH está regulada por TRH y por un ciclo de retroalimentación negativa en el que las hormonas T_3 y T_4 actúan a nivel pituitario e hipotalámico. Dado que el control por retroalimentación de la secreción de TSH es exquisitamente sensible a las hormonas tiroideas periféricas, la mayoría de los trastornos tiroideos pueden diagnosticarse midiendo los niveles de TSH y de las hormonas tiroideas. Por esta razón, para la toma de decisiones clínicas, la medición de TSH en suero humano ha sido establecida como la "primera línea" para el diagnóstico de la función tiroidea.

La mayoría de los métodos actuales para la determinación de TSH utilizados en los laboratorios clínicos son inmunoensayos heterogéneos "sandwich" que implican (1) enzimas, (2) sustratos fluorométricos o (3) marcadores quimioluminiscentes. En comparación con los inmunoensayos competitivos tradicionales, como los radioinmunoensayos, los inmunoensayos heterogéneos para cuantificar TSH ofrecen (1) límites de detección más bajos, (2) tiempo de respuesta rápido y (3) un rango de medición lineal más amplio. En virtud de su obvia importancia para el diagnóstico clínico, se ha realizado un esfuerzo constante para desarrollar métodos analíticos con alta sensibilidad para TSH en fluidos corporales humanos. Aunque la sensibilidad y la reproducibilidad de los inmunoensayos de TSH han ido mejorando progresivamente en los últimos 30 años, existen discrepancias analíticas en las determinaciones cuantitativas de TSH entre los sistemas disponibles comercialmente. La mayor variabilidad entre métodos se encuentra a bajas concentraciones de la hormona (por debajo de $0,4 \mu\text{UI/ml}$), debido a la menor capacidad de detección y a la sensibilidad analítica de los inmunoensayos en este rango de concentraciones.

En 1992, Sano y col. crearon una técnica llamada inmuno-PCR (IPCR), en la que reemplazaron la enzima de detección del ELISA por una sonda de ADN conjugada a biotina. Esta sonda de ADN luego es amplificada mediante PCR para la generación de señal, siendo el

número de amplicones producidos proporcionales a la cantidad antígeno detectado. Desde la aparición de esta técnica, diversas aplicaciones y estrategias de IPCR se han desarrollado para la detección de innumerables antígenos. A lo largo de los años, estos estudios han demostrado que un ensayo de IPCR puede mejorar el límite de detección de 10 a 10.000 veces más que el de un ensayo de ELISA homólogo.

En este trabajo de tesis desarrollamos un ensayo de ELISA sandwich y uno de IPCR altamente sensible, específicos para la detección de la hormona estimulante de la tiroides humana (hTSH). Se generó un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) contra hTSH por tecnología de hibridomas y se seleccionaron racionalmente combinaciones de anticuerpos. Se establecieron las condiciones de ensayo óptimas para la determinación de la hormona por ELISA sandwich y se seleccionaron dos pares de MAbs (B-4 y B-9). Estos prototipos de ELISA se evaluaron frente a patrones calibrados con la 2ª preparación internacional de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en comparación con un kit ELISA comercial. Aunque el límite de detección (LD) fue de 0,1 μ UI/ml en todos los casos, el prototipo de ELISA B-9 mostró un rendimiento analítico similar al kit de ELISA comercial. Por lo tanto, seleccionamos B-9 para desarrollar el ensayo de IPCR sandwich específico, utilizando el formato "Universal", en tubos de PCR estándar sin pretratamiento. La amplificación de la señal se logró a través de la interacción entre el MAb de detección biotinilado y la sonda de ADN mono-biotinilada, previamente autoensamblada con neutravidina. En comparación con los ELISAs evaluados, el ensayo de IPCR mostró un menor LD y un considerable aumento de la sensibilidad (pendiente), proporcionando una mejor resolución cuantitativa en el rango de bajas concentraciones de la hormona.

La sensibilidad, facilidad de uso y el bajo costo de la técnica IPCR desarrollada ubican a esta metodología como una plataforma potencial para la detección cuantitativa de hTSH en muestras de suero humano. Además, el método de IPCR descripto (universal) demostró ser un formato práctico y versátil, realizado en tubos de PCR estándar. Nuestros resultados respaldan el potencial de la técnica para su aplicación en el diagnóstico de los estados tiroideos y para la medición confiable de niveles bajos clínicamente relevantes. Consideramos que el método propuesto puede posicionarse como alternativa metodológica para el análisis de hormonas.

ABSTRACT

Thyroid gland function is regulated by the thyroid stimulating hormone (TSH), a glycoprotein hormone secreted by the pituitary gland comprising a heterodimer of α - and β -subunits. The glycoprotein α -subunit is common to TSH, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and human chorionic gonadotropin, whereas the β -subunit is unique and confers specificity of action. Gene transcription of both TSH α - and β -subunits is induced by hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH). Primarily in response to hypothalamic TRH, the mature TSH is released into the circulation. TSH induces thyroid hormone synthesis whereas releases and maintains trophic thyroid cell integrity. TSH secretion is in turn regulated by TRH and by a feedback-inhibiting loop in which free hormones triiodothyronine (T_3), thyroxine (T_4) act at both pituitary and hypothalamic levels. Because feedback control of TSH secretion by peripheral thyroid hormones is sensitive, most thyroid disorders can be diagnosed by measuring basal TSH and thyroid hormone levels. Thus, measurement of TSH in human fluids is utilized as a “first line” thyroid test, in order to assist clinical decision-making.

Most of the current TSH methods used in clinical laboratories are two-site “sandwich” heterogeneous immunoassays involving (1) enzyme, (2) fluorometric substrate, or (3) chemiluminescent labels. When compared with traditional competitive immunoassays, such as the radioimmunoassays, heterogeneous immunoassays for TSH offer (1) lower limits of detection, (2) rapid turnaround time, and (3) a wider linear measurement range. By virtue of its obvious importance for the clinical diagnosis, there has been an ongoing effort to develop analytical methods with high sensitivity for TSH in human body fluids. However, although the sensitivity and reproducibility of TSH immunoassays have been progressively improved in the last 30 years, some differences in terms of analytical performance and measured TSH concentrations still exist among the commercially available methods. The between-methods variability is the largest at low TSH concentrations (below 0,4 μ IU/ml), due to lower analytical sensitivity of some immunoassay methods.

In 1992, Sano et al. created a new technique called the immuno-polymerase chain reaction (commonly referred to as immuno-PCR or IPCR), in which they replaced the detection enzyme in ELISA with a biotinylated DNA probe. This DNA probe is then amplified by PCR for signal generation, being the number of PCR amplicons produced proportional to the initial quantity of antigen to be detected. Since Sano et al. created this technique, several IPCR methods have been developed for the detection of several antigens. These studies have shown that the IPCR is able to reach a 10- to 10.000-fold higher detection limit than an ELISA.

In this work, we developed both a conventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a highly sensitive immuno-polymerase chain reaction (IPCR) assay specific for detection of

human thyroid stimulating hormone (hTSH). Several anti-hTSH monoclonal antibodies (MAbs) were generated using hybridoma technology. Two pairs of MAbs (B-4 and B-9) were rationally selected and the optimal assay conditions of sandwich ELISAs were established. The ELISA prototypes were evaluated with standards calibrated with WHO 2nd International Reference Preparation for hTSH and in comparison with a commercial ELISA Kit. Although the limit of detection (LOD) was 0.1 μ IU/ml in all cases, B-9-ELISA showed an analytical performance similar to commercial ELISA Kit. Therefore, we selected the B-9 ELISA to develop a hTSH-IPCR assay applying an “Universal-IPCR” format in standard PCR tubes without pretreatment. The signal amplification was achieved through the interaction between the biotinylated detection MAb and mono-biotinylated DNA probe pre-self-assembled with neutravidin. The hTSH-IPCR assay showed a lower LOD and a highest sensitivity in terms of the slope definition of sensitivity, providing better quantitative resolution for a given amount of measurement error or, conversely, higher sensitivities can tolerate larger measurement errors for a given amount of quantitative resolution.

The sensitivity, ease of use, and low cost of IPCR support this technique as a potential platform for the detection of hTSH hormone in serum samples. Our results support the potential of IPCR technique for being applied in diagnosis of thyroid states and for reliable measurement of low clinically relevant human TSH levels. In addition, the IPCR method described involves a universal format of IPCR performed in standard PCR tubes. Therefore, we consider that the proposed method has exhibited great potentiality and could act as a good tool for hormone analysis.

CAPÍTULO I: **INTRODUCCIÓN GENERAL**

1. Aspectos básicos de fisiología endocrina

El sistema endocrino es uno de los principales sistemas responsables de la homeostasis del organismo. El metabolismo, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la presión sanguínea, las concentraciones de iones y de otras sustancias en la sangre, e incluso las conductas son influenciadas por el sistema endocrino. La fisiología endocrina implica varios aspectos funcionales. Uno de ellos es la secreción de hormonas a la circulación, que posteriormente son asimiladas en los tejidos diana donde producen un amplio espectro de respuestas fisiológicas [1]. Este proceso de síntesis hormonal se produce en respuesta a señales bioquímicas generadas por diversos sistemas moduladores. Los sistemas de regulación y retroalimentación involucrados en la homeostasis hormonal son característicos de prácticamente todo el sistema endócrino. La regulación puede incluir el sistema nervioso central o mecanismos de reconocimiento de señales presentes en las células glandulares. A su vez, el incremento o la disminución de la secreción hormonal también están regulados a través de vías neuroendocrinas [2]. Las glándulas endocrinas humanas son el hipotálamo, los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis, la tiroides, la paratiroides, la corteza suprarrenal, la médula suprarrenal, las gónadas, la placenta y el páncreas. El riñón también se considera una glándula endocrina y además hay células endocrinas por todo el tracto gastrointestinal [1]. En la Figura 1 se resumen gráficamente las glándulas endocrinas y de sus respectivas secreciones hormonales.

Algunas hormonas afectan a muchos tipos distintos de células del organismo; así la hormona de crecimiento (GH), producida por la hipófisis anterior, es la responsable del crecimiento de la mayoría de los tejidos y la tiroxina (originada en la glándula tiroides) incrementa la velocidad de muchas reacciones químicas en casi todas las células corporales. Otras hormonas actúan sólo en determinados tejidos efectores, ya que sólo estos tejidos poseen receptores para esas moléculas [3].

Una característica distintiva de las hormonas es la capacidad de actuar en rangos de concentraciones considerablemente bajos, en el orden comprendido entre 10^{-6} M y 10^{-12} M [4]. Algunas señales químicas transportadas en la sangre a objetivos distantes no se consideran hormonas porque deben estar presentes en concentraciones relativamente altas antes de que se note un efecto. Por ejemplo, la histamina liberada durante reacciones alérgicas graves puede actuar sobre las células en todo el cuerpo, pero su concentración excede el rango aceptado para una hormona [5].

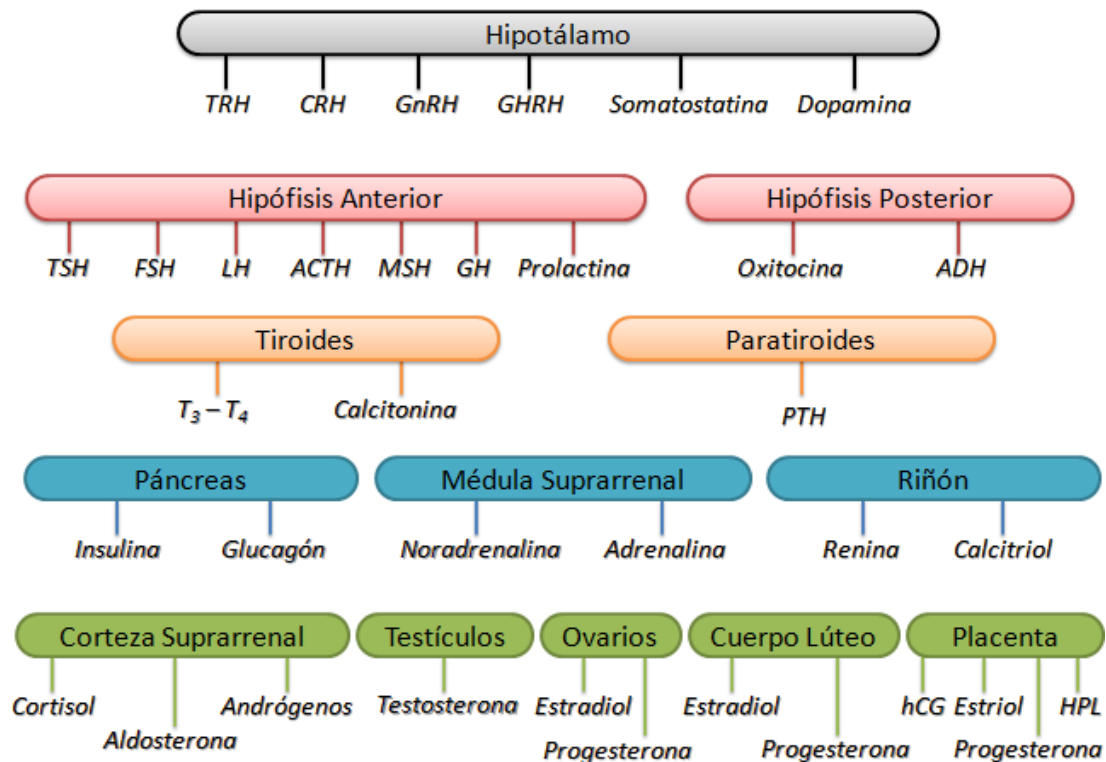


Figura 1: Glándulas endocrinas y hormonas secretadas (Figura modificada de Costanzo, 2011b). TRH: hormona liberadora de tirotropina; CRH: hormona liberadora de corticotropina; GnRH: hormona liberadora de gonadotropina; GHRH: hormona liberadora de la hormona de crecimiento; TSH: hormona estimulante de tiroides; FSH: hormona estimulante del folículo; LH: hormona luteinizante; ACTH: hormona adrenocorticotropa; MSH: hormona estimulante de los melanocitos; GH: hormona de crecimiento; ADH: vasopresina; T₃: triyodotironina; T₄: tiroxina; PTH: hormona paratiroidea; hCG: gonadotropina coriónica humana; HPL: lactógeno placentario humano.

Como se muestra en la Figura 2, las concentraciones de las hormonas necesarias para controlar casi todas las funciones metabólicas y endocrinas son, en general, muy bajas. A su vez, las distintas hormonas poseen ritmos o periodos de secreción, los que pueden ser estrechos o muy reducidos. La secreción hormonal está estrictamente regulada con el fin de mantener niveles circulantes propicios para obtener una respuesta del tejido diana fisiológicamente apropiada. Los tejidos efectores disponen de mecanismos muy especializados gracias a los cuales bajas concentraciones de hormonas ejercen un potente control de los sistemas fisiológicos [2].

Diversos trastornos pueden alterar la actividad normal del sistema endocrino como el deterioro de la síntesis o secreción de hormonas, interacciones anómalas entre hormonas y sus tejidos diana, y respuestas anormales de los éstos últimos. Las patologías endocrinas pueden agruparse según: 1) enfermedades por sobreproducción o infraproducción de hormonas, 2) enfermedades vinculadas a respuestas tisulares

alteradas, 3) enfermedades asociadas a la presencia de tumores en las glándulas endocrinas y 4) enfermedades debidas a la deficiencia hormonal por inactivación [2,6].

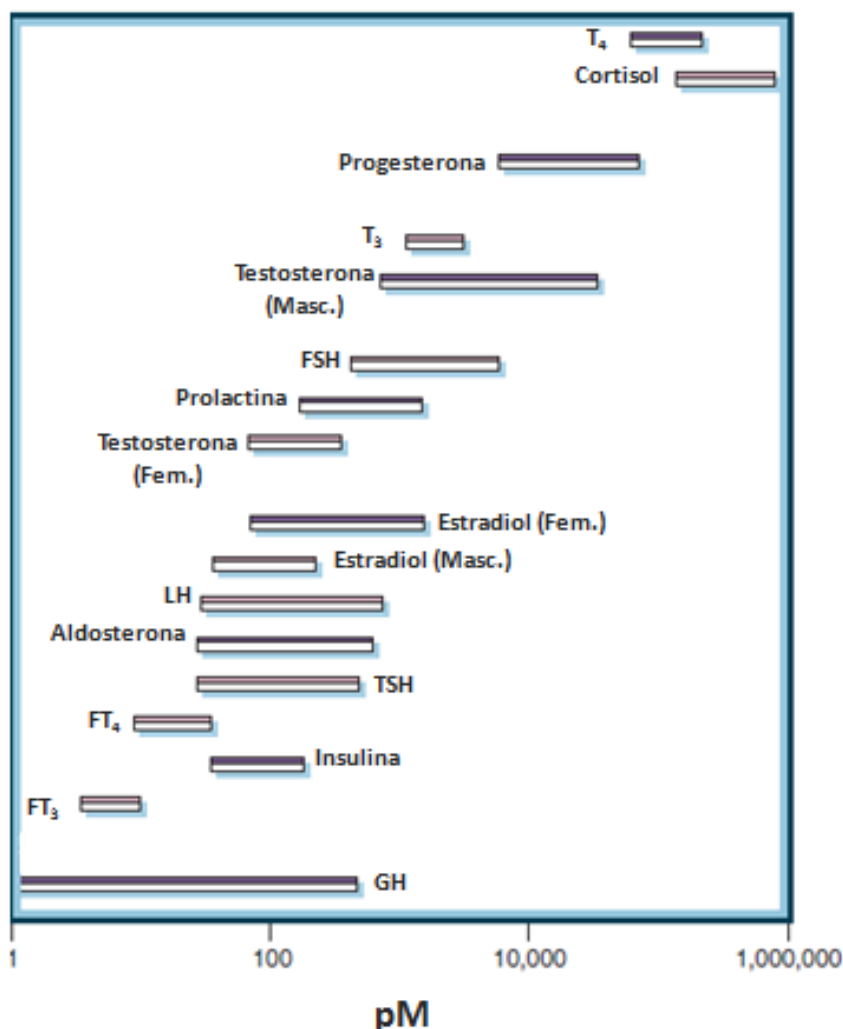


Figura 2: Rango normal de concentraciones hormonales en plasma o suero humano (Figura modificada de Shlomo Melmed y col., 2011b). FT₄, tiroxina libre; T₃, triyodotironina libre.

Consecuentemente, el diagnóstico y tratamiento de los trastornos endocrinos comprenden un aspecto importante de la medicina en general. Algunas patologías endocrinas, como la diabetes mellitus, alteraciones de las funciones tiroideas y los problemas reproductivos, son muy comunes en la población general y forman parte de las prácticas médicas habituales. A su vez, la endocrinología es un área de la medicina que es altamente dependiente de las determinaciones de laboratorio; la detección de pequeños cambios en los niveles hormonales implican mayor sensibilidad y especificidad en la detección temprana de enfermedades [4]. Por otro lado, es importante destacar que la concentración en suero o plasma de la mayoría de las

hormonas son mucho menores que la de otros analitos bioquímicos en general, por lo que son necesarias técnicas especializadas que permitan determinarlas en rangos de concentraciones extremadamente bajos. Más aún, el estudio de las enfermedades endocrinas requiere frecuentemente la integración de los hallazgos morfológicos con las determinaciones bioquímicas de las concentraciones de hormonas, sus reguladores y/o otros metabolitos relacionados [6]

2. Glándula tiroides y hormonas tiroideas

La tiroides es una glándula en forma de mariposa que se ubica en la base de la garganta, justo debajo de la laringe. Es una de las glándulas endocrinas más grande del cuerpo humano, con un peso normal comprendido entre 15 y 20 gramos en personas adultas. Está formada por dos lóbulos laterales voluminosos conectados por un istmo central relativamente delgado (Figura 3) [7].

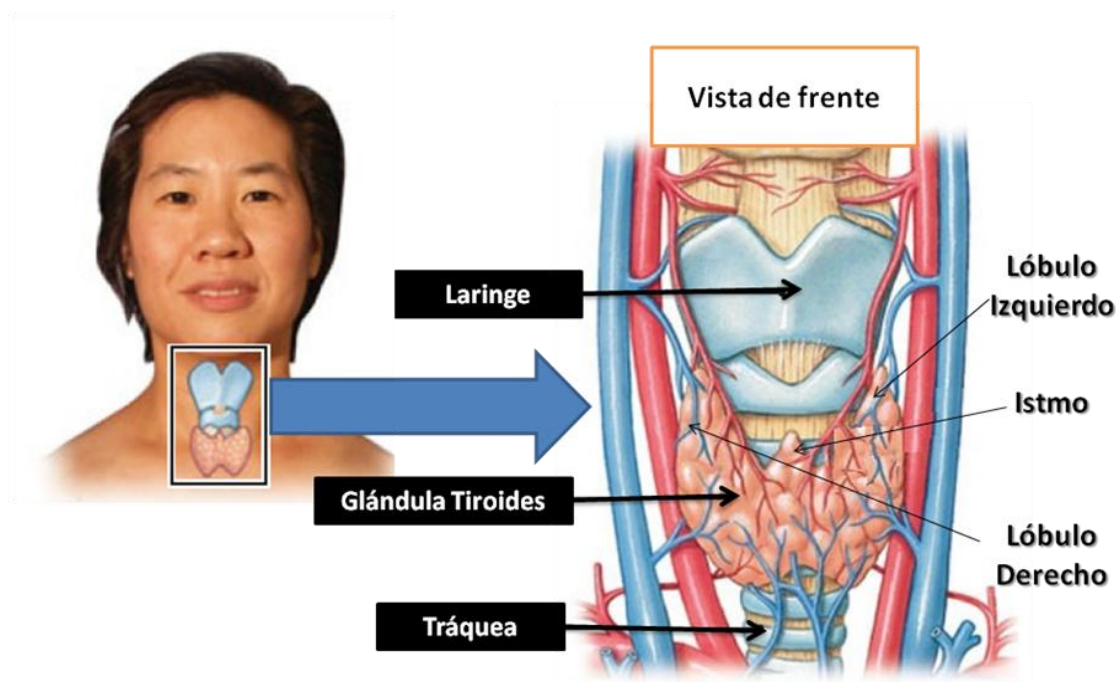


Figura 3: Anatomía de la tiroides (Figura modificada de Silverthorn, 2013b). La tiroides descansa en la base de la garganta, cerca de la tráquea. Tiene forma de mariposa, con el lóbulo derecho y el lóbulo izquierdo conectados por el istmo.

Las células foliculares de la glándula tiroides segregan dos hormonas principales: la triyodotironina (T_3) y la tetrayodotironina (o tiroxina, T_4); ambas están directamente involucradas con el aumento del metabolismo del organismo. Los bajos niveles de hormonas tiroideas provocan un descenso del metabolismo, mientras que la secreción

excesiva produce un notable incremento del mismo. Ambas hormonas tienen efectos sobre prácticamente la totalidad de los sistemas y tejidos del organismo, incluidos los que intervienen en el crecimiento y desarrollo normal. La glándula tiroides también produce y secreta calcitonina, una hormona asociada al metabolismo del calcio [8].

Las hormonas tiroideas forman parte de un grupo denominado hormonas amínicas u hormonas derivadas de aminoácidos. Son pequeñas moléculas generadas a partir de tirosina y están formadas por dos moléculas de este aminoácido conjugadas con átomos de yodo (Figura 4) [9].

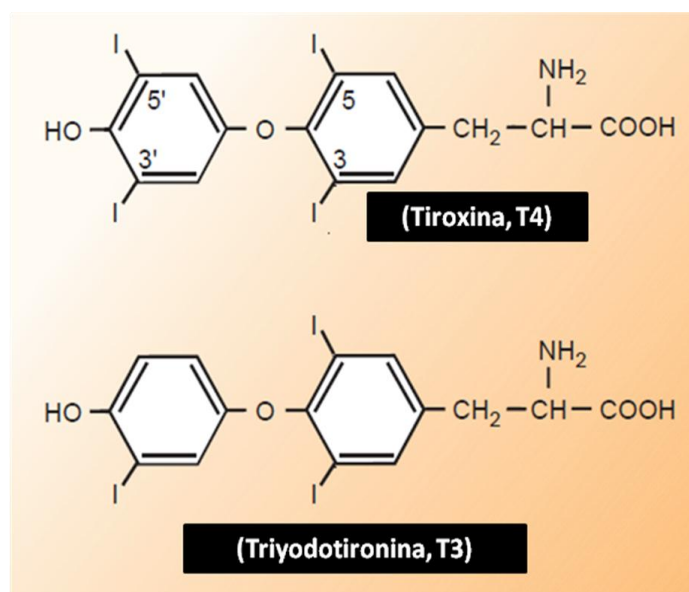


Figura 4: Estructura química de las hormonas tiroideas (Figura modificada de Rhoades y Bell, 2013a). Estructura química de las hormonas tiroideas derivadas del aminoácido tirosina.

Las estructuras de T₃ y T₄ difieren solamente por un solo átomo de yodo. Se sintetizan y almacenan en la glándula tiroides donde se incorporan a la proteína tiroglobulina (Tg), una macromolécula que se deposita en los grandes folículos característicos de esta glándula. La glándula tiroides es la única glándula endocrina que posee la capacidad de almacenar grandes cantidades de hormona. Una vez finalizada la síntesis de las hormonas tiroideas, cada molécula de tiroglobulina contiene hasta 30 moléculas de T₄ y algunas de T₃. De esta forma, los folículos pueden almacenar cantidad de hormona tiroidea suficiente para cubrir las necesidades normales del organismo durante dos o tres meses. Por consiguiente, cuando se interrumpe su síntesis, los efectos fisiológicos de la deficiencia tardan varios meses en hacerse evidentes [9].

2.1. Síntesis y secreción de T_3 y T_4

La síntesis de las hormonas tiroideas es más compleja que la de la mayoría de las hormonas humanas. Esto se debe a tres características poco frecuentes en su proceso de síntesis: (1) las hormonas tiroideas contienen grandes cantidades de yodo, que debe ingerirse adecuadamente con la dieta; (2) la síntesis es parcialmente intracelular y parcialmente extracelular; las hormonas completas se almacenan extracelularmente en el lumen folicular hasta que la glándula tiroides es estimulada para la secreción de las mismas; (3) aunque la T_4 es el principal producto secretor de la glándula tiroides, no es la forma más activa de la hormona [10].

Las hormonas tiroideas son sintetizadas por las células epiteliales foliculares de la glándula tiroides. Como se muestra en la Figura 5, estas células se disponen en folículos circulares de 200 a 300 μm de diámetro. Las células tienen una membrana basal en dirección a la sangre y una membrana apical que mira a la luz folicular. El material en la luz de los folículos se denomina coloide y está revestido de por células epiteliales cúbicas. El componente principal del coloide es la glicoproteína tiroglobulina (Tg), que posee un tamaño de 335 kDa y que es sintetizada y secretada por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Cada molécula de tiroglobulina contiene aproximadamente 70 aminoácidos tirosina, y son los principales sustratos que se combinan con el yodo para formar las hormonas tiroideas. Las hormonas T_4 y T_3 formadas a partir de los aminoácidos tirosina forman parte de la molécula de Tg durante la síntesis de las hormonas tiroideas e incluso después como hormonas almacenadas en el coloide folicular [8].

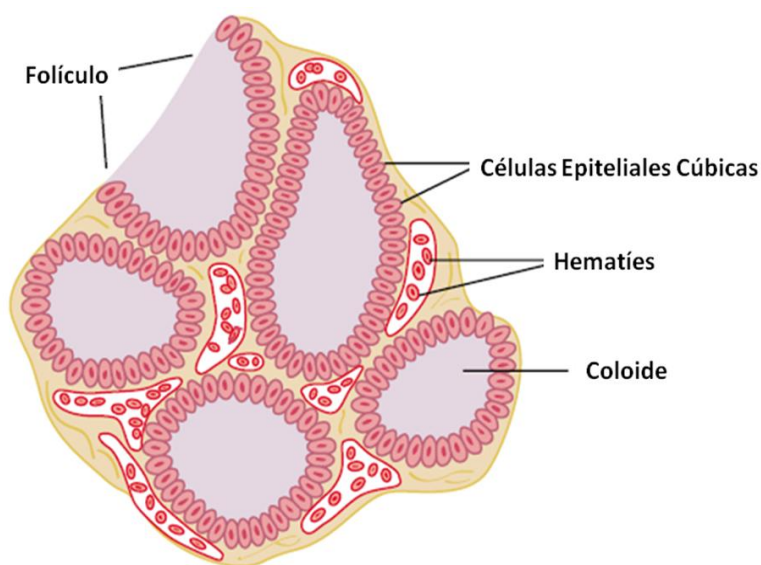


Figura 5: Aspecto microscópico de la glándula tiroides (Figura modificada de Guyton y Hall, 2006b).

En la Figura 6 se esquematizan los pasos claves del transporte de yodo y la biosíntesis de hormonas tiroideas en las células epiteliales foliculares, cuyas principales etapas se describen a continuación [4,7].

- A. Todos los pasos en la formación y secreción de las hormonas T_3 y T_4 resultan del estímulo desencadenado por TSH y la interacción con su receptor (TSHR) presente en las células tiroideas. TSHR, que pertenece a la familia de receptores glicoproteicos acoplados a proteína G, produce la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) de la membrana lo que genera la producción de AMPc en la célula, que actúa como segundo mensajero. Cuando el receptor se activa, se produce también la activación de la cascada de inositol-fosfato-diacilglicerol (DAG). La inducción de la señal mediante fosfolipasa C (PLC) regula el eflujo de yoduro, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la yodación de Tg. Por otro lado, la señal mediada por AMPc modula la absorción de yodo y la expresión de Tg, de la enzima peroxidasa tiroidea (TPO) y transportadores sodio-yoduro (NIS), todos éstos necesarios para la producción de hormonas tiroideas [11].

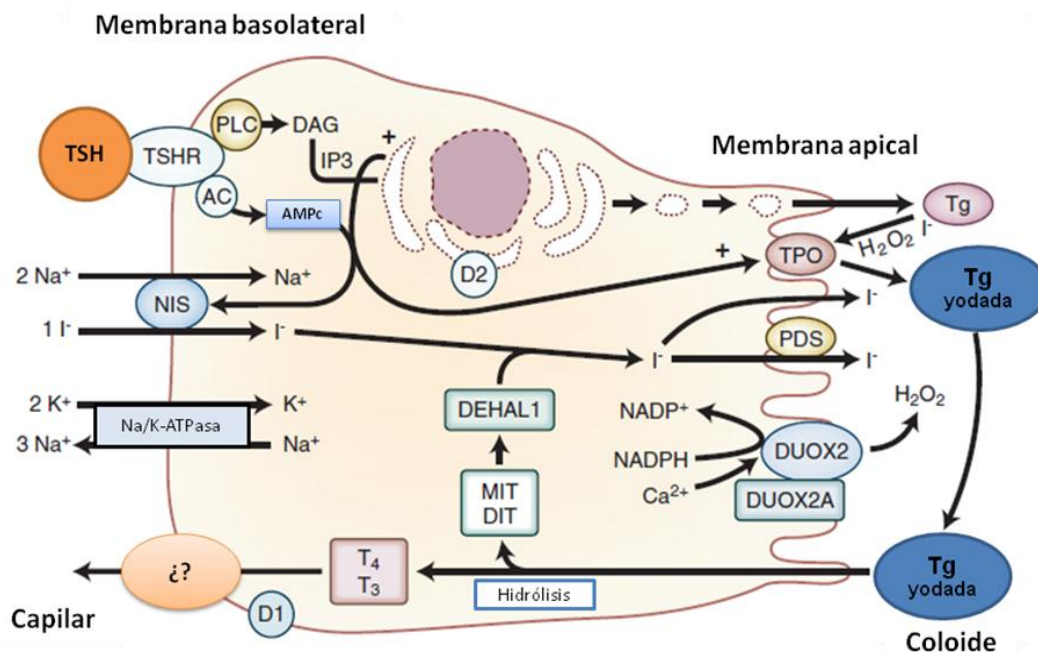


Figura 6: Transporte de yodo y síntesis de hormonas tiroideas en las células foliculares de la glándula tiroidea (Figura modificada de Shlomo Melmed y col., 2011c). TSHR, receptor de TSH; PLC, fosfolipasa C; AC, adenil ciclasa; NIS, transportador simporter de yoduro/sodio; DEHAL1, yodotirosina dehalogenasa 1; DUOX2 y DUOX2A, oxidasas; DIT, diyodotirosina; MIT, monoyodotirosina; $NADP^+$, forma oxidada del dinucleótido fosfato de adenosin nicotinamida; $NADPH$, forma reducida del dinucleótido fosfato de adenosin nicotinamida; PDS, pendrina; TPO, peroxidasa tiroidea; T_4 , tiroxina; T_3 , triyodotironina; Tg, tiroglobulina; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; IP3, trifosfato de inositol; D1, desyodasa tiroidea tipo 1; D2, desyodasa tiroidea tipo 2; DAG, diacilglicerol.

- B.** La síntesis de la glicoproteína Tg (330 kDa) es el primer paso para la síntesis de las hormonas tiroideas. Contiene grandes cantidades de tirosina y es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi de las células foliculares. Homodímeros de Tg son incorporados a vesículas secretoras y expulsadas al lumen folicular a través de la membrana apical. Más tarde, los residuos de tirosina de la Tg serán yodados para formar los precursores de las hormonas tiroideas (monoyodotirosina, MIT y diyodotirosina DIT). Esto requiere la formación de H_2O_2 por enzimas oxidasas (DUOX2 y DUOX2A) y de TPO, que cataliza la oxidación del yoduro y su transferencia a la tirosina.
- C.** Una vez que el yoduro (I^-) es bombeado al interior de la célula, atraviesa la misma hasta la membrana apical, donde es oxidado a yodo (I_2) por TPO. Ésta enzima cataliza la etapa de oxidación y también el acoplamiento de dos moléculas de DIT o uno de DIT y uno de MIT, dando lugar a formación de T_4 y T_3 (*organificación del yodo*).
- D.** El I^- utilizado para la yodación de la Tg proviene de la sangre y es introducido por transportadores *simporter* de sodio-yoduro (NIS) que están presentes en la membrana plasmática basal de la célula folicular. Aunque el transportador NIS no requiere ATP para transportar yoduro, sí lo requiere la bomba Na/K-ATPasa necesaria para mantener el gradiente de Na^+ . Una vez dentro de las células foliculares, los iones de yoduro difunden rápidamente a la membrana apical, donde un transportador denominado pendrina (PDS) lo transfiere al folículo para ser utilizado para la yodación de Tg.
- E.** En la membrana apical, inmediatamente por dentro de la luz del folículo, el I_2 se combina con las porciones de tirosina de la tiroglobulina, catalizada por TPO, para formar MIT y DIT. La MIT y la DIT siguen unidas a la Tg en la luz folicular hasta que la glándula tiroides es estimulada para secretar sus hormonas.
- F.** Todavía formando parte de la Tg, tienen lugar dos reacciones de acoplamiento distintas entre la MIT y la DIT, de nuevo catalizadas por la enzima TPO. En una reacción, 2 moléculas de DIT se combinan para formar T_4 . En la otra, una molécula de DIT se combina con una molécula de MIT para formar T_3 . La primera reacción es más rápida y, como consecuencia, se produce aproximadamente 10 veces más T_4 que T_3 . Una porción de MIT y DIT no se acopla (queda como “sobrante”) y

simplemente permanece unida a la Tg. Después de que se produzcan las reacciones de acoplamiento, la Tg contiene T_4 , T_3 y el sobrante de MIT y DIT. Esta Tg yodada se almacena en la luz folicular como coloide hasta que la glándula tiroides es estimulada para secretar sus hormonas (por ejemplo, por la TSH).

- G.** Cuando se estimula la glándula tiroides, la Tg yodada (con sus T_4 , T_3 , MIT, y DIT unidas) sufre un proceso de endocitosis hacia el interior de las células epiteliales foliculares. Los pseudópodos se escinden de la membrana celular apical, sumergen una porción de coloide y la absorben al interior de la célula por mecanismos de pinocitosis. Una vez en el interior celular, la Tg es transportada en la dirección de la membrana basal por acción microtubular.
- H.** Las vesículas de Tg se fusionan con las membranas lisosómicas dando lugar a la formación de fagolisosomas. A continuación, las proteasas lisosómicas hidrolizan los enlaces peptídicos para liberar T_4 , T_3 , MIT y DIT de la Tg. T_4 y la T_3 son transportadas a través de la membrana basal al interior de los capilares próximos para ser liberadas a la circulación sistémica. MIT y la DIT permanecen en la célula folicular y son recicladas para la síntesis de nueva Tg.
- I.** MIT y DIT son desyodadas en el interior de la célula folicular por las enzimas desyodasas tiroideas (DEHAL1). El I^- generado por esta etapa es reciclado al depósito intracelular y añadido al I^- transportado por la bomba. Las moléculas de tirosina se incorporan a la síntesis de nueva Tg para comenzar otro ciclo. Así, tanto el I^- como la tirosina son “reciclados” por las enzimas desyodasas.

Ambas hormonas son secretadas a la circulación sistémica donde la mayor parte de estos péptidos se unen de manera reversible a proteínas plasmáticas circulantes (globulina de unión a tiroxina). Las proteínas de unión funcionan como amortiguadoras para mantener la concentración sérica de T_3 y T_4 en márgenes estrechos para asegurar la disponibilidad para los tejidos [12]. En la periferia, la mayor parte de la T_4 sufre desyodación a T_3 ; esta última se une al receptor nuclear de hormonas tiroideas con una afinidad 10 veces mayor que la T_4 y con una actividad biológica proporcionalmente mayor [6]. Las hormonas tiroideas tienen diversos efectos celulares siendo el resultado neto un aumento del metabolismo basal.

2.2. Funciones fisiológicas de las hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas actúan sobre prácticamente la totalidad de los órganos o sistemas del organismo humano: actúan sinérgicamente con la hormona del crecimiento y las somatomedinas para promover la formación ósea; aumentan el metabolismo basal, la producción de calor y el consumo de oxígeno e influyen sobre los sistemas cardiovascular y respiratorio para aumentar el flujo de sangre y la liberación de oxígeno a los tejidos. Juegan un papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso central y también son esenciales para el crecimiento normal del cuerpo durante la infancia y en la regulación del metabolismo basal [10].

Como se esquematiza en la Figura 7, la primera etapa en la acción de las hormonas tiroideas en los tejidos diana es la conversión de T_4 en T_3 por la enzima yodinasa. Una vez que se produce T_3 en el interior de las células diana, se introduce en el núcleo y se une a un receptor nuclear. A continuación, el complejo T_3 -receptor se une a un elemento regulador del tiroides en el ADN, donde estimula la transcripción del ADN. Los ARNm recientemente transcritos son traducidos y se sintetizan nuevas proteínas, que son responsables de las múltiples acciones de las hormonas tiroideas. La naturaleza de las proteínas inducidas es específica del tejido diana [8].

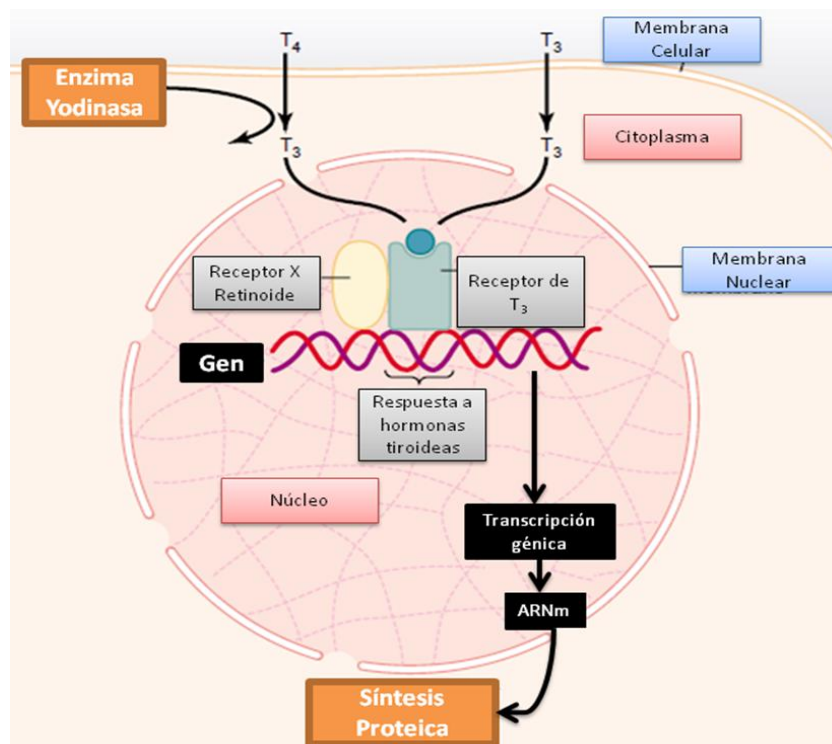


Figura 7: Esquema de activación de la expresión génica por acción de hormonas tiroideas (Figura modificada de Guyton y Hall, 2006b). Las hormonas T_4 y T_3 difunden fácilmente a través de la membrana celular. Gran parte de T_4 es desyodada para formar T_3 , que interactúa con el receptor de la hormona tiroidea. Esto causa un aumento en transcripción de genes que conducen a la formación de proteínas.

Los efectos de la hormona tiroidea (T_3) sobre los diversos órganos o sistemas son los siguientes [1,8,13]:

- **Índice metabólico basal.** Uno de los efectos más significativos y pronunciados de la hormona tiroidea es el aumento del consumo de oxígeno y el aumento consiguiente en el IMB y la temperatura corporal.
- **Metabolismo.** En último término, el mayor consumo de oxígeno depende de una mayor disponibilidad de sustratos para el metabolismo oxidativo. Las hormonas tiroideas aumentan la absorción de glucosa en el tracto gastrointestinal y potencian los efectos de otras hormonas (por ejemplo: las catecolaminas, el glucagón y la hormona del crecimiento) sobre la gluconeogénesis, la lipólisis y la proteólisis. Las hormonas tiroideas aumentan la síntesis y la degradación de las proteínas, pero globalmente su efecto es catabólico (es decir, degradación neta), lo que da lugar a la reducción de la masa muscular.
- **Cardiovascular y respiratorio.** Dado que las hormonas tiroideas aumentan el consumo de O_2 , crean una mayor demanda de O_2 en los tejidos. Una mayor liberación de O_2 es posible en los tejidos porque las hormonas tiroideas producen un aumento en el gasto cardíaco y en la ventilación. El aumento en el gasto cardíaco es consecuencia de la combinación de una mayor frecuencia cardíaca y del aumento en el volumen sistólico (aumento de la contractilidad).
- **Crecimiento.** Para el crecimiento hasta la estatura adulta es necesaria la hormona tiroidea. Ésta actúa sinérgicamente con la hormona del crecimiento y las somatomedinas para promover la formación ósea. Las hormonas tiroideas promueven la osificación y la fusión de las placas óseas y la maduración ósea.
- **Sistema nervioso central (SNC).** Las hormonas tiroideas tienen múltiples efectos sobre el SNC y el impacto de estos efectos depende de la edad. En el período neonatal son esenciales para la maduración normal del SNC.
- **Sistema nervioso autónomo.** La interacción de las hormonas tiroideas con el sistema nervioso simpático no se comprende completamente. Los efectos de las hormonas tiroideas y de las catecolaminas sobre la producción de calor, el gasto cardíaco, la lipólisis y la gluconeogénesis parecen ser sinérgicos.

2.3. Regulación de la secreción de las hormonas tiroideas

Con el fin de mantener una actividad metabólica normal en el organismo, es preciso que en todo momento se secreten una cantidad adecuada de hormonas tiroideas. Por ello, para mantener la homeostasis, la secreción de las hormonas ha de activarse y desactivarse según las necesidades. Para lograr esto existen mecanismos de retroalimentación que operan a través del eje hipotalámico-hipofisario y que controlan la secreción tiroidea [12,13]. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que actúa sobre las células tirotrofas de la hipófisis anterior para estimular la secreción de TSH (Figura 8). A continuación, ésta actúa sobre la glándula tiroides para estimular la síntesis y secreción de hormonas tiroideas.

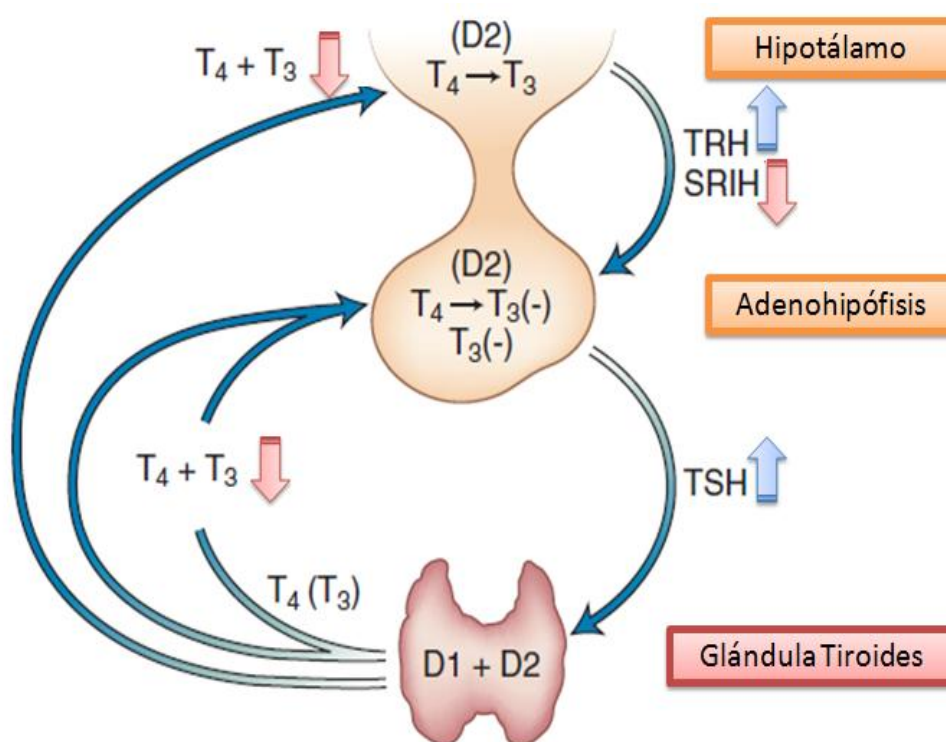


Figura 8: Regulación de la secreción de las hormonas tiroideas (Figura modificada de Shlomo Melmed y col., 2011c). Esquema de regulación de la secreción de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) por retroalimentación negativa. D1 y D2: enzimas desyodasas, catalizan la conversión de T_4 a T_3 .

Como se muestra en la Figura 8 y se describe a continuación, la secreción de hormonas tiroideas está regulada por factores recíprocos [4,14]:

- 1) La TRH del hipotálamo estimula la secreción de TSH por parte de la adenohipófisis.

- 2) La TSH actúa sobre la glándula tiroides induciendo la producción y la secreción de las hormonas metabólicamente activas T_3 y T_4 .
- 3) Las hormonas tiroideas secretadas inhiben la secreción de TSH por disminución del receptor de TRH en las células tirotrofas de la adenohipófisis. Este efecto de retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas está mediado por la T_3 libre, que es posible porque la adenohipófisis contiene la desyodinasas tiroidea (D2) que convierte T_4 en T_3 .
- 4) Las hormonas tiroideas inhiben la secreción de TRH por parte del hipotálamo y estimulan la producción de somatostatina (SRIH) que actúa sobre la adenohipófisis inhibiendo la producción de TSH.

Las acciones de TSH se inician cuando ésta se une a un receptor (TSHR) específico de membrana basal de la glándula tiroides (Figura 6). Se produce la activación de la enzima adenilato ciclasa (AC) de la membrana lo que genera la producción de AMPc en la célula, que sirve como segundo mensajero para la TSH. Se desencadenan dos tipos de acciones sobre la glándula tiroides. (1) Aumenta la síntesis y secreción de hormonas tiroideas al estimular cada etapa de la vía biosintética (captación y oxidación de I^- , organificación de I_2 en MIT y DIT, acoplamiento de MIT y DIT para formar T_4 y T_3 , endocitosis y proteólisis de la tiroglobulina para liberar T_4 y T_3 para secreción). (2) La TSH tiene un efecto trófico sobre la glándula tiroides que se observa cuando las concentraciones de TSH están elevadas durante un período prolongado y que lleva a hipertrofia e hiperplasia de las células foliculares tiroideas y al aumento del flujo de sangre tiroideo.

2.4. Fisiopatología de las hormonas tiroideas

Una de las alteraciones endocrinas más comunes son los trastornos asociados a las hormonas tiroideas. La constelación de signos y síntomas producidos por el exceso o la deficiencia de hormonas tiroideas son predecibles, a tenor de las acciones fisiológicas hormonales. Así, los trastornos de las hormonas tiroideas afectan al crecimiento, la función del SNC, el metabolismo basal y la producción de calor, el metabolismo de nutrientes y el sistema cardiovascular [10].

2.4.1. Hipertiroidismo

La tirotoxicosis es un estado hipermetabólico causado una concentración circulante elevada de las hormonas T_3 y T_4 . Comúnmente se denomina hipertiroidismo porque está causado habitualmente por una hiperfunción de la glándula tiroides. No obstante, en ciertas enfermedades, el problema está causado por una secreción excesiva de las hormonas preformadas, o por un origen extratiroideo y no por una hiperfunción de la glándula. Los términos hipertiroidismo primario y secundario se utilizan para designar trastornos fisiológicos por una anomalía tiroidea o por trastornos ajenos a la glándula tiroides respectivamente [6]. Las causas más frecuentes de tirotoxicosis están asociadas a hiperfunción de la glándula:

- **Adenoma tiroideo.** Se debe a un tumor que se desarrolla en el tejido tiroideo y que secreta gran cantidad de hormonas tiroideas.
- **Hiperplasia difusa** de la glándula asociada a enfermedad de Graves. La forma más común del hipertiroidismo es la enfermedad de Graves, un trastorno autoinmunitario causado por anticuerpos dirigidos contra el receptor de TSH en la membrana plasmática de las células foliculares tiroideas. Estos anticuerpos se unen al receptor de TSH, estimulando la glándula y causando el aumento de la secreción de hormonas tiroideas e hipertrofia de la glándula [9].
- **Bocio multinodular hiperfuncional.** Aumento de la glándula tiroides con hiperplasia considerable y plegamiento del revestimiento de las células foliculares en los folículos, por lo que el número de células también aumenta en forma notable. La secreción de cada célula se multiplica varias veces generando cantidades de hormonas tiroideas superiores en 5 a 15 veces su valor normal [12].

El diagnóstico del hipertiroidismo se basa en los síntomas y en la determinación de un aumento de las concentraciones de T_3 y T_4 . Las concentraciones de TSH pueden estar aumentadas o disminuidas, según sea la causa del cuadro hipertiroideo. Si la causa es la enfermedad de Graves, la neoplasia tiroidea o la administración exógena de hormonas tiroideas (hipertiroidismo simulado), las concentraciones de TSH estarán disminuidas por retroalimentación negativa en la adenohipófisis. Sin embargo, si la causa del hipertiroidismo es un aumento de la secreción de TRH o TSH (es decir, el trastorno se localiza en el hipotálamo o en la adenohipófisis), las concentraciones de TSH estarán aumentadas.

El diagnóstico del hipertiroidismo requiere de una interpretación entre la clínica y los exámenes de laboratorio. La determinación de la concentración sérica de TSH es el método de detección selectiva simple más útil para el hipertiroidismo porque esta concentración disminuye incluso en las etapas iniciales cuando la enfermedad puede ser todavía subclínica.

2.4.2. Hipotiroidismo

El hipotiroidismo es un trastorno causado por una alteración estructural o funcional que interfiere en la producción de hormonas tiroideas. Puede estar causado por un defecto en cualquier punto del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Al igual que el hipertiroidismo, se divide en primario y secundario según esté causado por una anomalía tiroidea intrínseca o por una enfermedad hipofisaria o hipotalámica [6]. La causa más común de hipotiroidismo es la destrucción autoinmunitaria de la glándula tiroides (tiroiditis), en la que los anticuerpos pueden destruir totalmente la glándula o bloquear la síntesis de hormonas tiroideas [12]. Otras causas de hipotiroidismo son la extirpación quirúrgica del tiroides como tratamiento del hipertiroidismo, la insuficiencia hipotalámica o hipofisaria y la deficiencia de I⁻. Rara vez el hipotiroidismo es consecuencia de resistencia del tejido diana debida a regulación por disminución de los receptores de las hormonas tiroideas [10].

- **Hipotiroidismo congénito.** En todo el mundo, el hipotiroidismo congénito es causado con mayor frecuencia por una deficiencia endémica de yodo en la dieta. Otras formas menos frecuentes son los “errores” innatos del metabolismo tiroideo, causado por defectos en cualquiera de los múltiples pasos que conducen a la síntesis de la hormona tiroidea. En raras ocasiones puede haber ausencia completa de parénquima tiroideo (agenesia tiroidea) o la glándula tiroides puede tener un tamaño reducido (hipoplasia tiroidea) por mutaciones en la línea germinal en genes responsables del desarrollo tiroideo.
- **Hipotiroidismo autoinmunitario.** El hipotiroidismo autoinmunitario es la causa más frecuente de hipotiroidismo en las regiones del mundo sin déficit de yodo. La gran mayoría de estos casos corresponden a tiroiditis de Hashimoto, causada por autoanticuerpos circulantes.
- **Hipotiroidismo secundario.** Está causado por deficiencia de TSH y, con mucha menor frecuencia, de TRH. Cualquiera de las causas de hipopituitarismo (tumor

hipofisario, necrosis hipofisaria posparto, traumatismo o tumores no hipofisarios) o de daño hipotalámico por tumor, traumatismo, radioterapia o enfermedad infiltrante puede causar un hipotiroidismo secundario.

El diagnóstico del hipotiroidismo se basa en los síntomas y en el hallazgo de una disminución de las concentraciones de T_3 y T_4 . Según sea la causa del hipotiroidismo, las concentraciones de TSH pueden estar aumentadas o disminuidas. Si el defecto está en la glándula tiroides (p. ej., tiroiditis), las concentraciones de TSH estarán aumentadas por retroalimentación negativa; las concentraciones bajas de T_3 en sangre estimulan la secreción de TSH. Si el defecto radica en el hipotálamo o en la hipófisis, las concentraciones de TSH estarán disminuidas.

Según el informe Merck-Serono publicado en la revista especializada “Consultor de Salud” en 2009, en la Argentina hay 2 millones de personas que están afectadas por hipotiroidismos clínicos y subclínicos y en menor grado por hipertiroidismo. Además, las tiroideopatías no son raras durante el embarazo, observándose hipotiroidismo en el 2,5% de las embarazadas e hipertiroidismo en el 0,2%. Las disfunciones tiroideas tendrían importantes consecuencias tanto en el feto como en la madre, asociándose a complicaciones durante la gestación y a alteraciones en el desarrollo neurológico fetal. El hipotiroidismo puede estar presente en los recién nacidos y su detección tiene especial importancia, ya que si no es tratado provoca un retardo mental severo e irreversible [15].

3. Metodologías para la determinación de alteraciones endocrinas

Como se mencionó anteriormente, las concentraciones de la mayoría de las hormonas necesarias para controlar casi todas las funciones metabólicas y endocrinas son extremadamente bajas (Figura 2). Sus valores en la sangre oscilan desde tan sólo 1 picogramo en cada mililitro de sangre hasta, como mucho, algunos microgramos por mililitro de sangre [12]. Por esto razón es indispensable disponer de técnicas con alta capacidad de detección y elevada especificidad. Desde fines del siglo XX, las herramientas de detección para el seguimiento, tratamiento y comprensión de los procesos biológicos han sido desarrolladas en base a aplicaciones derivadas de la genética, inmunología y farmacología, sumadas a la participación histórica de la química analítica, bioquímica y fisiología [15]. Una gran variedad de técnicas para la determinación de alteraciones endocrinas están disponibles en la actualidad, siendo los

inmunoensayos y la espectrometría de masas las metodologías más difundidas a nivel mundial [2].

3.1. Inmunoensayos enzimáticos

Los inmunoensayos han sido utilizados para la cuantificación de proteínas desde 1959 [16] y desde entonces se han convertido en una herramienta versátil y poderosa en materia de sistemas de diagnóstico [17,18]. Los inmunoensayos enzimáticos o EIA (*enzyme immunoassay*), usan las propiedades catalíticas de las enzimas para detectar y cuantificar reacciones inmunológicas. Ejemplos de ensayos tipo EIA son ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), EMIT (*Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*) y CEDIA (*Cloned Enzyme Donor Immunoassay*).

El ensayo de ELISA es una técnica de EIA heterogénea en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o de otro tipo [19]. En esta técnica, uno de los componentes de la reacción está unido a la superficie de una fase sólida, como la de un pocillo en una placa de microtitulación. Esta unión facilita la posterior separación de reactivos unidos y libres. Típicamente, en un ensayo de ELISA, una alícuota de la muestra o calibrador conteniendo el antígeno a ser medido es agregado y se facilita su unión al anticuerpo unido a la fase sólida o anticuerpo de captura. Luego del lavado, otro anticuerpo conjugado con una enzima o anticuerpo de detección es agregado y reconoce al antígeno, formándose un complejo tipo “*sandwich*” de anticuerpo de captura - antígeno - anticuerpo de detección (Figura 9). El exceso de anticuerpo no unido es eliminado por lavados sucesivos y luego se agrega el sustrato de la enzima. Ésta cataliza la conversión del sustrato a un producto cuya cantidad es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Las enzimas más utilizadas en ensayos EIA son: fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa-6-deshidrogenasa y β -galactosidasa.

Aunque los inmunoensayos enzimáticos tipo ELISA ofrecen una manera simple y eficaz de cuantificar un analito, la sensibilidad del ensayo está limitada por la calidad de los anticuerpos utilizados y la capacidad del espectrofotómetro para cuantificar el cambio de color. A pesar de su eficacia y su especificidad, el ELISA presenta limitaciones para la detección de algunos antígenos cuando éstos están presentes en bajas concentraciones y/o en matrices complejas. A manera de ejemplo, tal es la situación con los antígenos de la hepatitis B [20], que usan una baja tasa de transcripción de sus genes como un

mecanismo de persistencia en el huésped. En general y dependiendo del sistema de generación de señal, el límite de detección (LD) de un ensayo de ELISA se encuentra entre los ng/ml y los pg/ml [21-23].

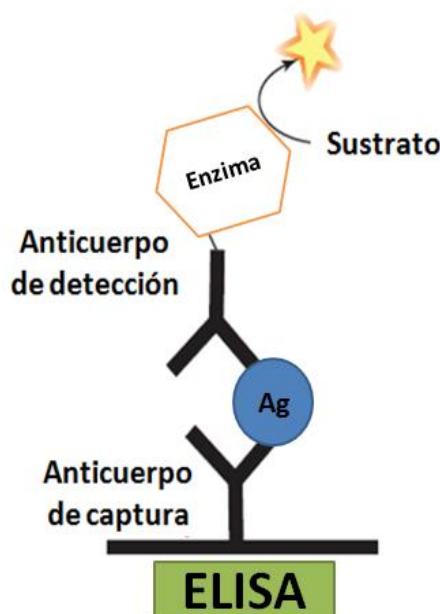


Figura 9: Esquema general de un ensayo de ELISA sandwich. Un anticuerpo conjugado a una enzima convierte un sustrato en un producto detectable. La absorbancia producida es proporcional a la cantidad inicial del antígeno de interés.

Otras variaciones muy difundidas de los inmunoensayos enzimáticos incluye los de inmunofluorescencia [24] y los radioinmunoensayos (RIA). Estos últimos se basan en la marcación de anticuerpos o antígenos con radioisótopos que permitan la detección cuantitativa del analito de interés por medio de lecturas radiométricas. Estas estrategias están entre las primeras utilizadas en el desarrollo de inmunoensayos con fines diagnósticos, lográndose capacidades de detección extremadamente bajas, en el orden de los pg/ml [25].

A medida que la tecnología de análisis basada en anticuerpos continúa expandiéndose, se han ido incorporando tecnologías y desarrollos más recientes. Tal es el caso de herramientas de biología molecular y desarrollos en el área de las nanobiotecnologías que proporcionan estrategias de mejora de las técnicas existentes. La detección de las interacciones anticuerpo-antígeno ya no se limita a la actividad enzimática. Otros compuestos macromoleculares, en particular nanobiosensores basados en ADN y metodologías de detección asociadas a la formación de estructuras de ADN se están utilizando cada vez más en materia de sistemas de diagnóstico [26-28].

Actualmente la detección de un bajo número de moléculas de ácidos nucleicos es una técnica de rutina en muchos laboratorios gracias a la capacidad de amplificación exponencial de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica se ha convertido en uno de los métodos más populares para la detección directa de ácidos nucleicos. La elevada sensibilidad de la PCR, que es capaz de detectar hasta una sola molécula de ADN [29], la convierte en una excelente opción para estudios con fines de diagnóstico. Metodologías que combinan la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) con ensayos basados en anticuerpos pueden lograr incrementos significativos de sensibilidad con respecto a un inmunoensayo homólogo convencional [30].

3.2. Desarrollo de una nueva metodología

En 1992, Sano y col. [31], desarrollaron el método denominado inmuno-PCR (IPCR). Tomando ventaja de conjugados específicos que comprenden un anticuerpo y un fragmento de ADN marcador, la metodología de IPCR combina la versatilidad del ELISA con la potencia de amplificación y sensibilidad de la PCR. Como consecuencia, el LD de un ELISA dado es, en general, unas 100 - 10.000 veces mayor por el uso de la PCR como un sistema de amplificación de señal (Figura 10) [32].

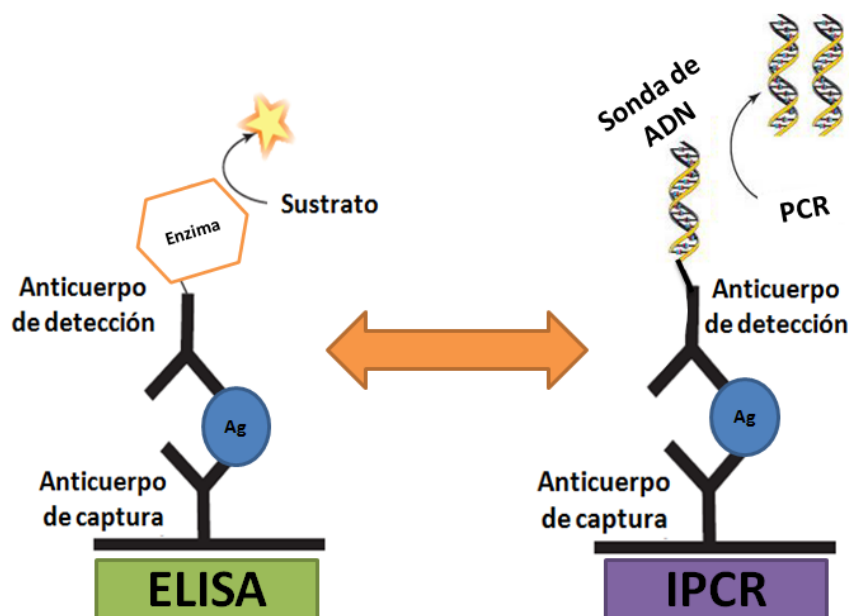


Figura 10: Esquemas generales de ensayos de ELISA e IPCR sandwich. Mientras que en el ELISA un anticuerpo conjugado a una enzima convierte un sustrato en un producto detectable colorimétricamente, en IPCR se utiliza un anticuerpo conjugado a una sonda de ADN. Luego se agregan oligonucleótidos específicos, nucleótidos y enzima polimerasa y la sonda es amplificada por PCR para la generación de señal. El número de amplicones producidos es proporcional a la cantidad inicial de antígeno capturado por el inmunocomplejo.

En el trabajo pionero de Sano y col. [31], una proteína recombinante del tipo “quimera”, compuesta por cadenas polipeptídicas de proteína A y estreptavidina (A-STV), fue usada como una molécula *linker*. Dado que la proteína A se une selectivamente a la región Fc de inmunoglobulina G (IgG) y que estreptavidina (STV) se une a la pequeña molécula de biotina con extraordinaria especificidad y afinidad [33], la proteína quimera A-STV puede ser utilizada para unir el anticuerpo específico con una cadena de ADN doble cadena biotinilada por la mezcla en la relación estequiométrica adecuada de los tres componentes (Figura 11a). Sin embargo, el uso de esta quimera quedó limitado a los formatos de IPCR directa. En ensayos donde se utilizan dos o más anticuerpos (*sandwich*), la proteína quimera A-STV produciría una señal inespecífica ya que se uniría con afinidad similar tanto al anticuerpo de captura como el de detección generando una señal independiente de la concentración de antígeno presente en la muestra en estudio. A pesar de estas limitaciones, el sistema A-STV ha sido utilizado exitosamente en aplicaciones de IPCR basadas en un formato de ensayo de IPCR directa [34].

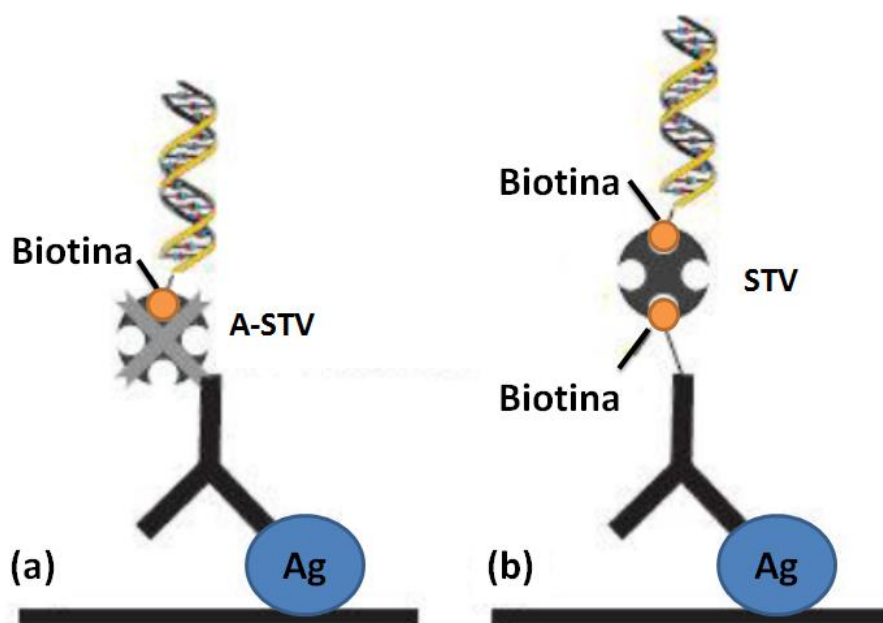


Figura 11: Moléculas linker utilizadas en los modelos pioneros de IPCR. (a) Quimera conformada por la fusión de proteína A-STV, que puede ser usada como molécula linker entre la cadena de ADN biotinilada y la fracción Fc de IgG. (b) “IPCR Universal”, combinación de estreptavidina (STV), un anticuerpo conjugado a biotina y ADN también conjugado a biotina.

Debido a la versatilidad y alta afinidad de la unión biotina-avidina, muchos grupos exploraron este sistema de acoplamiento para generar componentes reactivos de IPCR. Los primeros intentos de Ruzicka y col. [35] incluyeron el uso de ADN conjugado a

biotina, IgG conjugada a biotina y avidina, ensambladas por la mezcla de los mismos en la relación estequiométrica adecuada. Este formato para la formación de complejos ADN-anticuerpo, denominado por Zhou y col. [36] como “IPCR universal”, aún es el formato más empleado en la mayoría de las aplicaciones de IPCR publicadas hasta el momento (Figura 11b). Actualmente, uno de los principales desafíos que presenta la técnica de IPCR y que da lugar una variedad de formatos existentes, es el desarrollo de estrategias para la formación de complejos ADN-anticuerpo de detección.

3.3 Generalidades de la técnica de IPCR

Como se describió anteriormente, la metodología de IPCR combina la versatilidad de un inmunoensayo con la amplificación exponencial de la PCR, otorgándole una capacidad de detección ultrasensible. En términos generales, un ensayo de IPCR es muy similar a un ELISA, el cual en lugar de utilizar una enzima conjugada a un anticuerpo de detección, utiliza un anticuerpo unido a una sonda de ADN que posteriormente será amplificada por una reacción de PCR para la generación de la señal de detección. La amplificación exponencial del ADN a través de la PCR aprovecha las propiedades intrínsecas del ADN para ser utilizado como sonda para la generación de señal. Incluso una sola molécula de ADN puede amplificarse conduciendo a niveles de detección mayores a los de los ELISA convencionales [37-40]. En la técnica de IPCR se emplea una sonda de ADN que reemplaza al cromóforo típicamente usado en los ensayos de ELISA. Cuando la sonda de ADN se amplifica por PCR, el número resultante de amplicones es proporcional a la cantidad de antígeno detectado por los anticuerpos. La combinación de la especificidad de los anticuerpos con el poder de amplificación de la PCR ha abierto una nueva gama de técnicas analíticas para la detección ultrasensible de moléculas de interés en diversas áreas de estudios médicos-clínicos.

La metodología de IPCR requiere el uso de una molécula de enlace (*linker*) entre el ADN marcador y el anticuerpo de detección. El antígeno adsorbido en fase sólida es detectado por un anticuerpo específico. Las moléculas *linker* unen el complejo antígeno-anticuerpo a la secuencia de ADN, la que posteriormente es amplificada por PCR generando una cantidad de producto de amplificación que es proporcional a la cantidad de antígeno detectado por los anticuerpos específicos. Independientemente de la estrategia utilizada para formar el complejo sonda de ADN reportero – anticuerpo de detección, la cuantificación del antígeno de interés se puede determinar por análisis a partir de electroforesis en geles de agarosa de los fragmentos amplificados (Figura 12b)

[41-43], o por detección en tiempo real de las curvas de amplificación (Figura 12a) [44-46] luego de la reacción de PCR de amplificación de señal de detección. En la Figura 12 se muestra un esquema general de un ensayo de IPCR de captura del antígeno (*sandwich*), donde el inmunocomplejo formado (anticuerpo de captura – antígeno – anticuerpo de detección) es detectado por amplificación de la sonda de ADN por PCR, unida al anticuerpo de detección. Actualmente, las estrategias para formar los complejos ADN (sondas)-anticuerpos de detección, dan origen a una gran diversidad de potenciales formatos del ensayo.

Además de la mejora en el LD con respecto a un ELISA tradicional, la sensibilidad de IPCR permite el análisis de cantidades muy pequeñas de muestra, lo que la posiciona como una metodología muy interesante para ser aplicada en estudios clínicos donde generalmente sólo se dispone de cantidades pequeñas de la misma [32]. Más aún, IPCR puede ser aplicado en principio a una gran diversidad de matrices biológicamente complejas (suero, sangre, orina, saliva, materia fecal, cultivo celular, alimentos y extractos vegetales), lo que expande su aplicabilidad potencial a muchas áreas de interés.

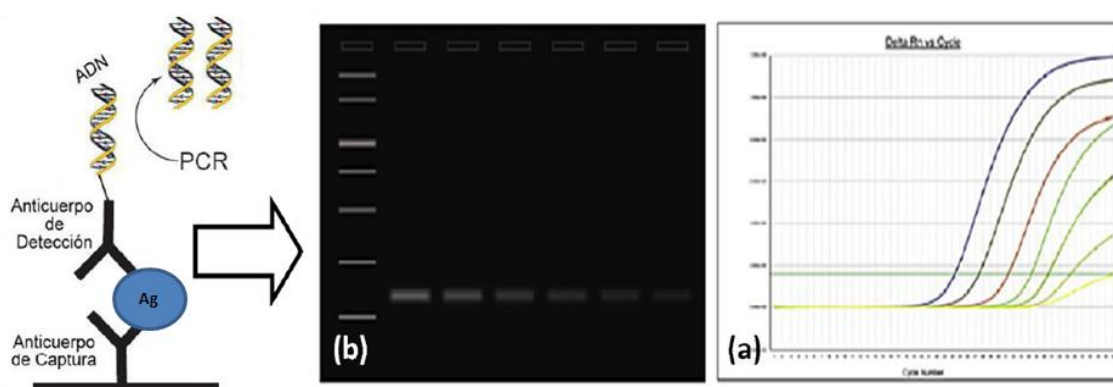


Figura 12: Generación de señal de detección en ensayos de IPCR (Figura modificada de Le Chang y col, 2016). Esquema general de ensayo de IPCR que utiliza un anticuerpo de captura y anticuerpo de detección unido a la sonda de ADN que es amplificada por PCR para la generación de señal de detección. El número de amplicones producidos es proporcional a la cantidad inicial de antígeno capturado por el inmunocomplejo. (a) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos en la reacción de detección. (b) Detección en tiempo real de las curvas de amplificación de las sondas de ADN.

4. Desarrollos y estrategias más utilizadas en IPCR

En los últimos años, la nanobiotecnología ha surgido como una de las herramientas más prometedoras en el desarrollo de estrategias aplicadas al diagnóstico [47] y a los

sistemas de bioanálisis en general [48]. Estos avances han permitido reducir los LD, aumentar dramáticamente la sensibilidad y simplificar protocolos, posicionando a la IPCR como una metodología versátil y potente. Las estrategias nanobiotecnológicas aplicadas a la técnica de IPCR serán abordadas brevemente en esta sección.

4.1. Conjugación covalente de sondas de ADN y anticuerpos

Una de las estrategias utilizada desde los desarrollos iniciales de la técnica de IPCR, fue la unión covalente de la sonda de ADN al anticuerpo de detección [49]. Ha sido utilizada en formatos directos, indirectos, *sandwich* y en ensayos IPCR tipo *multiplex* (detección de varios antígenos en simultáneo). Si bien, en los últimos años se han desarrollado muchos métodos para lograr la unión covalente ADN-anticuerpos, que depende de la presencia de grupos químicos funcionales como aminas primarias (-NH₂) y sulfhidrilos (-SH), su síntesis sigue siendo muy compleja y relativamente costosa. En general, los agentes comerciales de conjugación más difundidos (*Heterobifunctional Crosslinker*, Thermo Fisher Scientific) utilizan dos grupos químicos que actúan sobre sustratos separados [50]. Un grupo químico reacciona con el ADN al que se le ha incorporado un grupo funcional en su extremo 5', mientras que el otro se dirige al grupo químico funcional presente en el anticuerpo, formando un conjugado covalente estable entre las dos moléculas (ADN-anticuerpo) [51,52] (Figura 13). La funcionalización de anticuerpos puede lograrse mediante reacciones enzimáticas [53], etiquetado químico [54] o por la incorporación de aminoácidos específicos [55].

Estas estrategias suelen ser laboriosas, con bajos rendimientos y no necesariamente aplicables a todos los sistemas. Los métodos de conjugación requieren de una química compleja y sistemas de purificación por cromatografía. Una de las mayores limitaciones del acoplamiento covalente es la incapacidad de los anticuerpos para tolerar las condiciones químicas severas asociadas a las purificaciones cromatográficas, necesarias para eliminar el ADN no conjugado luego del acoplamiento entre ADN y anticuerpo. Por lo tanto, no sorprende que la estrategia de enlace covalente no haya sido ampliamente utilizada hasta la fecha como sí lo son otras estrategias de IPCR. De esta manera, el ensamblado *in situ* del formato IPCR Universal termina siendo una opción muy práctica frente a la necesidad de una síntesis y purificación complejas desde el punto de vista técnico para generar los conjugados de ADN-anticuerpo.

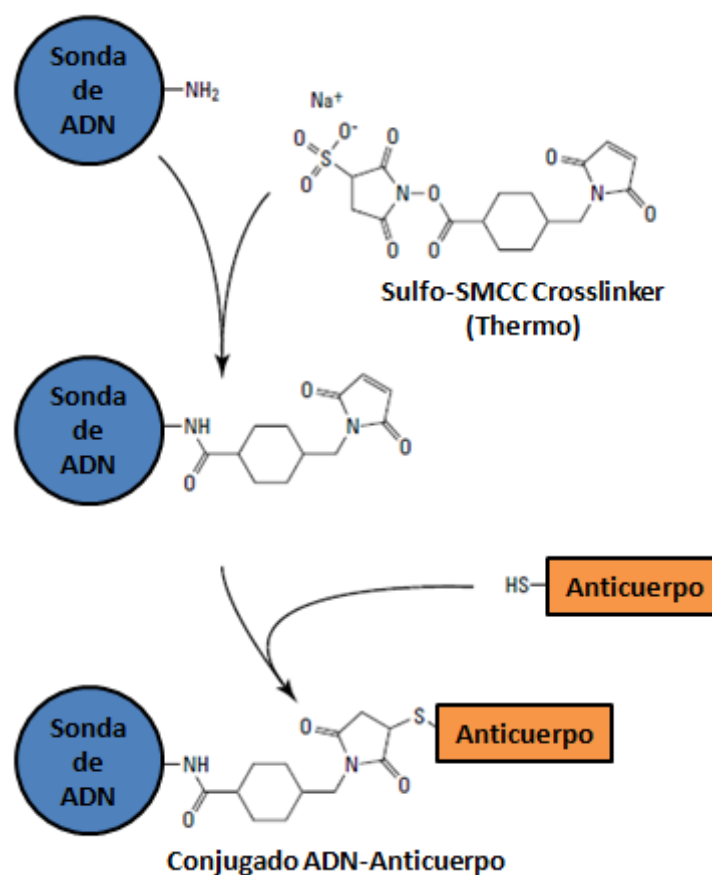


Figura 13: Reacción de conjugación covalente ADN - anticuerpo (Figura modificada de Thermo Scientific Crosslinking Technical Handbook). Conjugación de un oligonucleótido modificado (-NH_2) con una anticuerpo que contiene el grupo reactivo sulfhidrilo (-SH) de un residuo de cisteína utilizando un reactivo de conjugación bifuncional (Sulfo-SMCC; Heterobifunctional Crosslinker).

4.2. Nanopartículas funcionalizadas

Considerando que la IPCR comprende la formación de un inmunocomplejo adsorbido en una superficie sólida (captura del antígeno), y que éste es detectado por amplificación de la sonda de ADN (unida al anticuerpo de detección) por PCR en un termociclador, implica etapas con características fisicoquímicas muy diferentes. El material plástico más utilizado para fabricar tubos de PCR es el polipropileno, básicamente por su gran resistencia a los cambios de temperatura. A diferencia de las placas de ELISA (poliestireno), están diseñados para reacciones en medio líquido (PCR) y no para la adsorción de anticuerpos en fase sólida. Si bien existen tubos o placas comerciales exclusivamente acondicionadas para reacciones de IPCR, la principal limitación es que el soporte plástico utilizado debe ser compatible con el termociclador disponible en el laboratorio. Con la incorporación de las nanopartículas funcionalizadas

en los ensayos de IPCR se ha logrado aumentar considerablemente la sensibilidad del método y eludir en cierta forma las limitaciones antes mencionadas.

La utilización de nanopartículas de oro (AuNPs) es una de las estrategias más difundidas y utilizadas desde hace mucho tiempo en inmunoensayos de todo tipo. Fundamentalmente, en IPCR, las AuNPs se utilizan para unir el anticuerpo de detección a muchas copias de sondas de ADN con el fin de amplificar la señal y aumentar considerablemente la sensibilidad del ensayo [56] (Figura 14). Como se muestra en la Figura 14, el antígeno es capturado por un anticuerpo específico adsorbido a la placa y posteriormente el anticuerpo de detección, unido a la AuNPs funcionalizada con múltiples sondas de ADN, se une formando el inmunocomplejo para la detección del analito por amplificación de las sondas por PCR en tiempo real. La posibilidad de formar complejos estables de múltiples copias de sondas de ADN por anticuerpo de detección, permitió un salto cuantitativo muy importante en la técnica de IPCR.

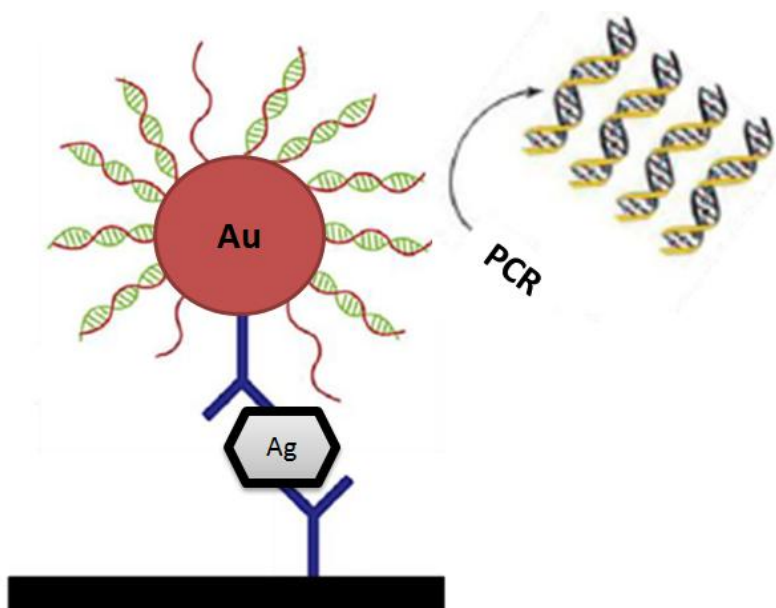


Figura 14: Nanopartículas de oro e IPCR (Figura modificada de Le Chang y col, 2016). Utilización de nanopartículas de oro funcionalizadas para su utilización en ensayos de IPCR. El antígeno es capturado por el anticuerpo adsorbido en fase sólida y el anticuerpo de detección unido a la AuNPs funcionalizada con las sondas de ADN se une formando el inmunocomplejo. Las sondas de ADN unidas a la partícula de oro son posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real para la generación de la señal de detección.

Otra de las “nanoherramientas” más utilizadas en el campo de los bioanálisis son las partículas magnéticas (MNPs), especialmente los óxidos ferrosos (Fe_3O_4) [57]. Las MNPs se pueden separar fácilmente de matrices complejas simplemente aplicando un campo magnético. Por otro lado, las MNPs permiten tanto la preconcentración del

analito antes de la detección, como la eliminación completa de interferentes de la matriz o reactantes no unidos específicamente, lo que contribuye a altas señales de fondo. Como se muestra en la Figura 15, en un ensayo de IPCR basado en perlas magnéticas funcionalizadas con proteína G, el anticuerpo de captura se adsorbe a las perlas que son recapturadas en fase sólida usando una placa magnética. De esta forma, las MNPs al ser liberadas de la fuerza magnética, circulan libremente en solución durante la incubación con antígeno o anticuerpo. De igual manera se realizan las sucesivas etapas de incubación y lavado para la formación del inmunocomplejo y posterior reacción de detección por PCR. En general, son formatos de ensayos relativamente sencillos que además pueden ser fácilmente miniaturizados y/o automatizados.

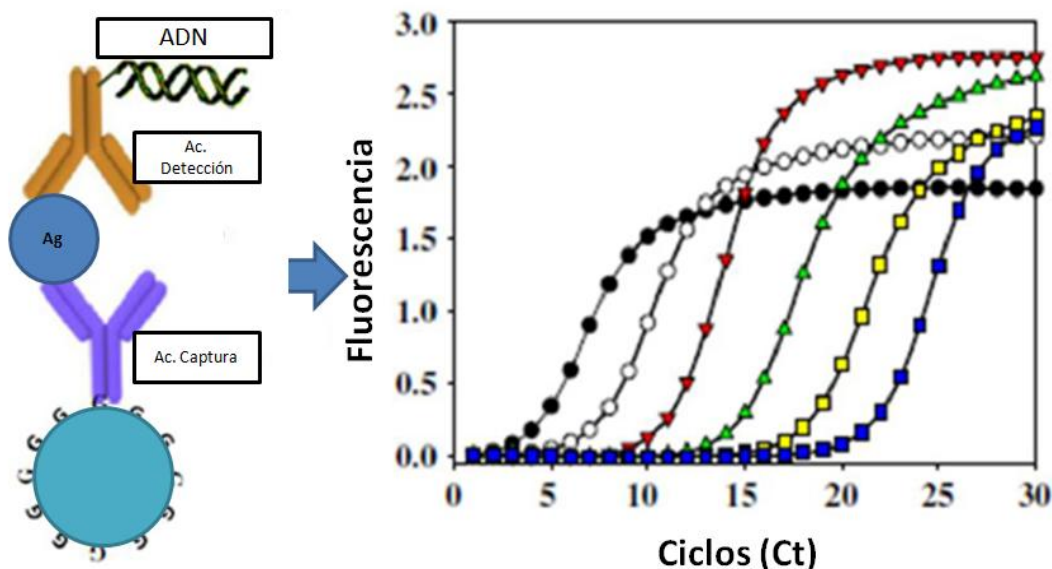


Figura 15: Nanopartículas magnéticas e IPCR (Figura modificada de Babu y col, 2011). Utilización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con proteína G en ensayos de IPCR. El antígeno es capturado por el anticuerpo adsorbido a la MNPs que es influenciado en cada etapa por un campo magnético. El anticuerpo de detección unido a la sonda de ADN se une finalmente formando el inmunocomplejo. Las sondas de ADN son posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real para la generación de la señal de detección.

Trabajos publicados más recientemente combinan la utilización de nanopartículas funcionalizadas para unir sondas de ADN al anticuerpo de detección, con partículas magnéticas que favorecen la adsorción en fase sólida del inmunocomplejo. Como se muestra en la Figura 16, el antígeno se captura utilizando MNPs funcionalizadas con anticuerpos [58]. Las nanopartículas de oro se conjugan al anticuerpo de detección y se funcionalizan con sondas de ADN para su posterior amplificación por PCR para

generación de la señal de detección. Todo el inmunocomplejo metálico puede ser retenido o liberado de la fase sólida bajo la acción de un campo magnético, eliminando así los interferentes en cada etapa. Las sondas de ADN unidas a la partícula de oro son posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real generando una cantidad de producto de amplificación que es proporcional a la cantidad de antígeno detectado por los anticuerpos específicos (Figura 16).

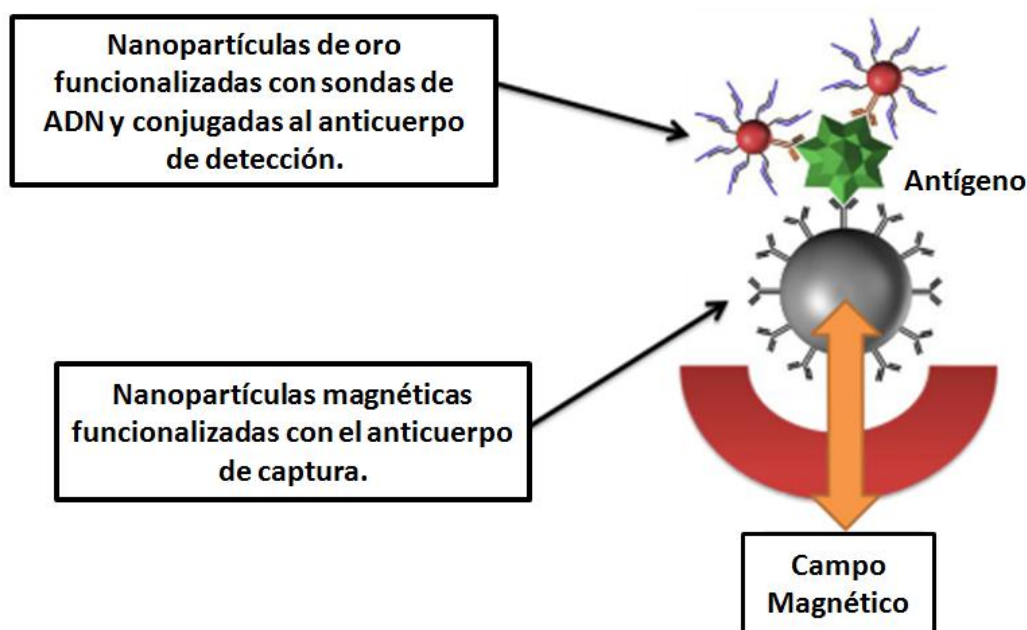


Figura 16: Nanopartículas funcionalizadas e IPCR (Figura modificada de Perez y col., 2011). Utilización de sistemas mixtos de nanopartículas magnéticas funcionalizadas en ensayos de IPCR. El antígeno es capturado por el anticuerpo adsorbido a la MNPs que es influenciado en cada etapa por un campo magnético. Las sondas de ADN unidas a la partícula de oro son posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real para la generación de la señal de detección.

4.3. Nanobioestructuras

En los últimos años se han reportado el uso de nanobioestructuras aplicadas a formatos de IPCR basados en la incorporación de sondas de ADN al interior de estructuras biológicas funcionalizadas (Figura 17a y 17b). Se demostró que la encapsulación de sondas de ADN en liposomas funcionalizados con elementos de reconocimiento tales como anticuerpos o proteínas receptoras (avidina) ofrece dos ventajas capitales. Primero, dado que se encuentran presentes múltiples copias de la sonda de ADN por cada partícula liposomal, se logra una mayor sensibilidad, lo que conduce a límites ultrasensibles de detección. Segundo, el ADN encapsulado en los liposomas es impermeable a la degradación enzimática. Esto permite proteger la sonda de ADN de la

degradación prematura debido a los componentes de la matriz, pero también permite al operador tratar la muestra con ADNasa para eliminar cualquier posible contaminación de fondo. Por ejemplo, Mason y col. (2006) desarrollaron un constructo de detección de PCR basado en liposomas en el que se encapsularon sondas de ADN dentro de la bicapa lipídica de un liposoma de 115 nm en el que se incorporaron receptores gangliósidos (conocidos por unirse a toxinas biológicas) y reportaron sensibilidades de detección tan bajas como 0,1 atomolar [59].

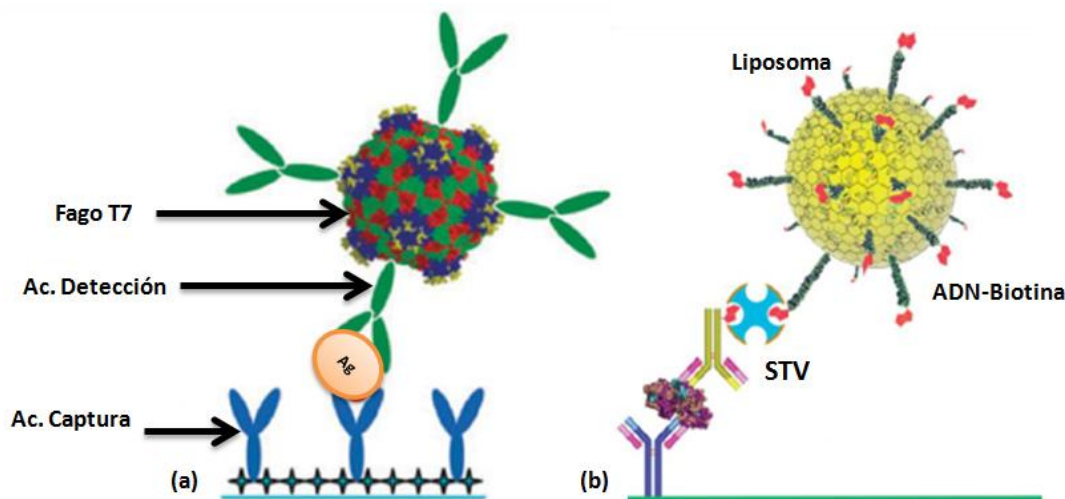


Figura 17: Nanobiopartículas e IPCR (Figuras modificadas de Heng Zhang y col., 2013 y de He y col., 2012). Utilización de nanobiopartículas en ensayos de IPCR. (a) Diagrama esquemático de un ensayo de IPCR donde se utiliza una partícula viral que contiene ADN que será utilizado como sonda. La nanobiopartícula está formada por un complejo de Fago T7 y múltiples copias del anticuerpo de detección específico. (b) Utilización de vesículas liposomales funcionalizadas y cargadas con múltiples copias de sondas de ADN. El antígeno es capturado por el anticuerpo adsorbido en fase sólida. La vesícula liposomal que contiene las sondas de ADN encapsuladas, se une por medio de la interacción estreptavidina-avidina al anticuerpo de detección. Finalmente, las sondas de ADN son liberadas del liposoma y posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real para la generación de la señal de detección.

Más recientemente, se han descrito construcciones de inmuno-liposomas "genéricos" que pueden unirse a cualquier anticuerpo de detección biotinilado [60]. En la Figura 17b se muestra la utilización de una nanoesfera liposomal aplicada a un ensayo de IPCR. Las sondas de ADN encapsuladas en la vesícula liposomal funcionalizada con moléculas de biotina, se unen por medio de la interacción estreptavidina-biotina al anticuerpo de detección. Finalmente, las sondas de ADN son liberadas del liposoma y posteriormente amplificadas por PCR en tiempo real para la generación de la señal de detección.

Otra estrategia nanobiotecnológica que ha cobrado importancia en los últimos años en los ensayos de IPCR, es la utilización de partículas de fago recombinante en lugar de conjugados de anticuerpo-ADN. Al igual que en el caso de los liposomas, la superficie de las partículas virales pueden ser funcionalizadas con técnicas de biología molecular ya establecidas (Figura 17a). De esta manera pueden expresar en sus superficies múltiples proteínas de reconocimiento específicas, como anticuerpos de detección o fragmentos de ellos. A diferencia de los liposomas, el ADN que actúa como sonda está incorporado en el interior de la partícula viral, no se encuentra en múltiples copias. En un ensayo de IPCR con nanobiopartículas virales, el ADN es liberado de la nanopartícula en la etapa final (lisis) y posteriormente amplificado por PCR para la generación de la señal de detección. Como se muestra en la Figura 18, para funcioanalizar la partícula viral, se expresaron en su superficie las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo de detección, conectadas a través de un pequeño péptido (ScFv). Luego de la formación del inmunocomplejo, la detección del antígeno específico se logra mediante la amplificación del ADN viral.

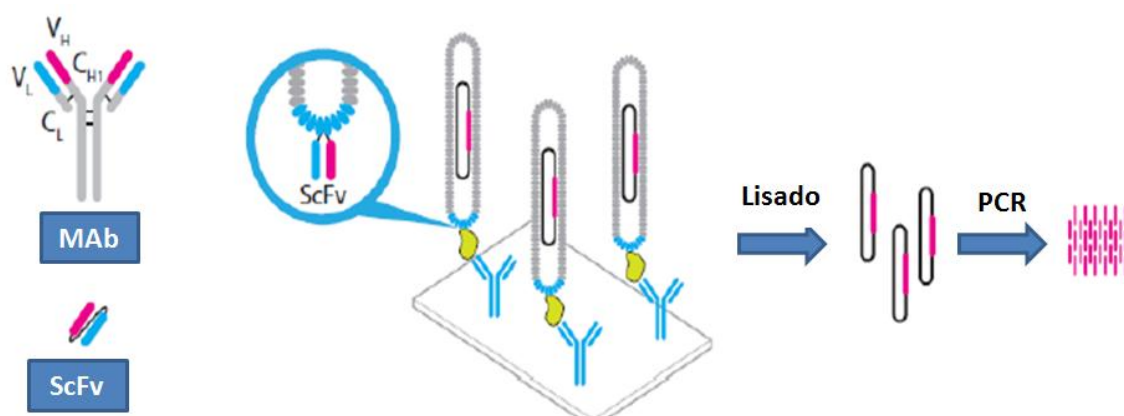


Figura 18: Nanobiopartículas virales e IPCR (Figura modificada de Janssen y col., 2013). Esquema de un ensayo de IPCR donde se utiliza una un complejo de detección compuesto por un Fago T7 y las fracciones ScFv del anticuerpo de detección.

Los avances en materia nanobiotecnológica que se han aplicado en el campo de los ensayos de IPCR han proporcionado mejoras sustanciales en la capacidad de detección de los sistemas involucrados, permitiendo la detección en el rango de la ultrasensibilidad (fg/ml). Estos desarrollos permiten el análisis en volúmenes reducidos, lo que posiciona a los distintos formatos de IPCR como metodologías aplicables en

estudios clínicos, especialmente en aquellas situaciones donde sólo se cuenta con pequeñas cantidades de muestra.

5. Aplicaciones de la técnica de IPCR

A pesar del incremento en la sensibilidad y en el LD, por mucho tiempo el número de trabajos relativos a IPCR fue reducido. La mayoría de sus aplicaciones estuvieron dirigidas a aspectos de trabajos de investigación básicos con protocolos demandantes, el requerimiento de un alto grado de entrenamiento tanto en ELISA como en PCR y el uso de reactivos escasos desde el punto de vista comercial. Sin embargo, los avances en el desarrollo de moléculas *linker* y estrategias para la conjugación de moléculas de ADN a proteínas, la disponibilidad de reactivos *ready-to-use* con protocolos menos laboriosos y el diseño de nuevos formatos, está tornando a la IPCR un método alternativo para el diagnóstico y la detección de analitos de interés.

Los avances en los aspectos metodológicos incorporados a partir de desarrollos nanobiotecnológicos han permitido que en los últimos años se observe un incremento en las aplicaciones de la técnica de IPCR. Desde que Sano y col. (1992) crearon la metodología, diferentes estrategias han surgido con el fin de unir la sonda de ADN al anticuerpo de detección [21,61,62] y muchos formatos de IPCR se han desarrollado para la detección de diversas moléculas [30,39,63], incluyendo antígenos virales [46,51,64], antígenos bacterianos [43], priones [65,66], toxinas [45,67], marcadores tumorales [37], citoquinas [68], hidrocarburos policíclicos aromáticos [69-71], hormonas [41,44] así como para test de inmunogenicidad [72]. En conjunto, estos y otros estudios han demostrado que la técnica de IPCR es capaz de alcanzar límites de detección ultrasensibles, de 10 a 10.000 veces mayor que un ensayo de ELISA convencional.

En resumen, se pueden identificar tres ventajas principales de la IPCR que promueven el desarrollo de esta metodología:

- ❖ Mejoras en el nivel de detalle en comparación con los inmunoensayos convencionales: numerosos ejemplos han demostrado la ventaja de IPCR, por ejemplo, en la detección de marcadores tumorales, antígenos virales y en estudios de farmacocinética.
- ❖ Utilización de volúmenes de muestra pequeños: la alta sensibilidad de los ensayos basados en IPCR permite el análisis de tamaños de muestra menores a un

microlitro. Así, los estudios clínicos pueden llevarse a cabo incluso cuando sólo se dispone de bajas cantidades de material biológico. Esto es de particular interés en medicina humana (pediatría).

- ❖ Compatibilidad con matrices biológicas complejas: debido a la alta sensibilidad de la IPCR, la muestra biológica puede generalmente ser diluida con soluciones tampón, reduciendo significativamente los efectos de fondo de la matriz biológica.

CAPÍTULO II:

OBJETIVOS DEL TRABAJO

DE TESIS

1. Objetivo General

El problema analítico relacionado con la evaluación del estado tiroideo es la baja sensibilidad de los inmunoensayos cuando los niveles de TSH en suero humano son bajos. Por otro lado, la conversión de un ELISA a la metodología de IPCR está asociada en la mayoría de los casos con un incremento significativo de la sensibilidad analítica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de tesis consiste en el desarrollo de sistemas diagnósticos de la hormona estimulante de tiroides (TSH) basados en un ensayo inmunométrico tipo ELISA *sandwich* e IPCR *sandwich*.

2. Objetivos Específicos

- i. Obtener un panel de anticuerpos monoclonales (MAbs) capaces de reconocer específicamente a la hormona TSH en suero humano.
- ii. Desarrollar un sistema de detección cuantitativo de TSH en suero humano, basado en un inmunoensayo tipo ELISA *sandwich*.
- iii. Desarrollar de un sistema de detección cuantitativo de TSH en suero humano, basado en un inmunoensayo tipo IPCR *sandwich*.

CAPÍTULO III: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-TSH

1. Introducción

1.1. Producción de anticuerpos monoclonales (MAbs)

La inmunización de un animal resulta en la activación de linfocitos B y la posterior producción de anticuerpos capaces de reconocer cientos o incluso miles de epitopes. La magnitud de la respuesta es dictada por la inmunogenicidad del antígeno inyectado. Esta colección de anticuerpos producidos por muchos linfocitos B diferentes es denominada policlonal, debido a los varios clones de células B de las cuales derivan. En este sentido, un suero policlonal está compuesto de una colección de anticuerpos monoclonales. Desafortunadamente, cuando las células B son removidas de un animal y tratadas de cultivar *in vitro*, mueren rápidamente a menos que sean transformadas e immortalizadas de alguna manera. Anticuerpos monoclonales son aquellos producidos por un clon de células secretoras de inmunoglobulinas (linfocitos B). De esta manera, cada uno de estos clones tiene la capacidad de producir un anticuerpo que reconoce un solo epítopo. Los anticuerpos monoclonales constituyen una clase de anticuerpos que tienen la propiedad de ser homogéneos y monoespecíficos contra un antígeno definido. En 1975 Köhler G. y Milstein C. [73], reportaron por primera vez la obtención de anticuerpos monoclonales específicos contra un inmunógeno determinado con características reproducibles y podían producirse de manera continua a partir de líneas celulares establecidas. Mediante esta tecnología fue posible immortalizar clones de células secretoras de inmunoglobulinas (linfocitos B) con células de mieloma. Los anticuerpos así producidos se denominaron posteriormente anticuerpos monoclonales obtenidos por tecnología de hibridomas.

Los hibridomas son células somáticas inmortales que reúnen las propiedades de las células parentales que le dan origen. Estas células son, por un lado los linfocitos B, los cuales se obtienen a partir de ratones inmunizados con un determinado antígeno y producen un anticuerpo específico para un determinante antigénico en particular. Por otro lado, se encuentran las células de mieloma, que le confieren a la célula híbrida la capacidad de reproducirse indefinidamente (inmortalidad). La fusión de ambos tipos celulares genera la línea híbrida secretora de MAbs que reúne la información genética de ambos tipos celulares: el mieloma provee los genes que le confieren su inmortalidad y el linfocito B provee los genes que codifican para la expresión de la inmunoglobulina monoclonal.

Hay tres aspectos fundamentales en la preparación de anticuerpos monoclonales:

- **Células parentales:** se utilizan células de mieloma defectivas en la enzima HGPRT (Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferasa), involucrada en la vía de salvataje de purinas, y células esplénicas, que expresan la enzima HGPRT pero que no pueden crecer *in vitro*. A su vez, las líneas de células de mieloma a utilizar deben ser no productoras de inmunoglobulinas. Así mismo, es importante que la línea de mieloma provenga de la misma especie animal usada para la extracción de los esplenocitos. Entre las líneas de mieloma se encuentran las pertenecientes a las líneas NS0 y Sp2/0, que derivan de ratones BALB/c, una de las especies más utilizadas para la producción de MAb por la tecnología de hibridomas.
- **Fusión celular:** el agente más utilizado para la fusión de células de mamífero es el polietilenglicol (PEG). El PEG fusiona las membranas plasmáticas de las células adyacentes generando una célula híbrida que contiene dos o más núcleos. Esta célula heterocariota retiene el material genético hasta que las membranas nucleares se disuelven para iniciar la división mitótica. Por la existencia de un número anormal de cromosomas, la segregación de los mismos no siempre genera grupos cromosómicos idénticos en las células de la progenie y algunos de ellos pueden perderse durante el proceso. Si los cromosomas segregados o perdidos son codificantes para alguna de las secuencias necesarias para la expresión de las inmunoglobulinas monoclonales, la producción de las mismas se detendrá y resultará en un híbrido no secretor o uno inestable que continuará eliminando su material genético. Esto llevará finalmente a la inestabilidad de la línea y posteriormente a la muerte celular.
- **Selección de células híbridas:** el método más común consiste en utilizar células deficientes en HGPRT y cultivar las células en un medio enriquecido con hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). En estas condiciones, sólo pueden sobrevivir aquellas células que expresan HGPRT. La aminopterina bloquea la síntesis de novo de ácidos nucleicos. HGPRT utiliza guanina o hipoxantina para sintetizar purinas mediante la vía de salvataje, debido a que la síntesis de novo se encuentra bloqueada por la aminopterina. El agregado de timidina permite a la célula producir TMP (timidina monofosfato) vía timidina kinasa. Debido a que

las células de mieloma utilizadas se caracterizan por ser defectivas en HGPRT (línea celular NS0), y a que las células esplénicas son incapaces de crecer in vitro en condiciones de cultivo celular, sólo los hibridomas podrán crecer en este medio de selección, al haber incorporado en su genoma la información necesaria para la expresión de dicha enzima.

1.2. Familia de hormonas glicoproteicas

Las hormonas glicoproteicas (HGP) incluyen tres hormonas hipofisiarias, las gonadotropinas hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), así como la hormona estimulante de la tiroides (TSH o tirotropina) [74]. Sólo en primates y equinos también se encuentra una gonadotropina coriónica (CG) secretada por la placenta [75]. Las gonadotropinas FSH y LH desempeñan un rol central en la reproducción de los vertebrados, ya que transmiten la información central integrada desde el eje hipotálamo-hipófisis hacia las gónadas tanto en machos como en hembras. Como se describió anteriormente, la TSH es también secretada por la adenohipófisis, bajo el control de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y es modulada por la retroalimentación tiroidea mediante la acción de la T_4 y T_3 . La gonadotropina coriónica humana (hCG) es secretada por células trofoblásticas de la placenta en las mujeres durante el embarazo.

Las HGP son las moléculas más complejas con actividad hormonal y son esenciales para el normal crecimiento, desarrollo y reproducción [76]. Las características estructurales y las propiedades biológicas de estas hormonas han estado bajo intensa investigación durante muchos años. Actualmente se conocen en detalle las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de muchas especies, y hay extensa información con respecto a la composición y estructura de los residuos hidrocarbonados asociados y participación en la función biológica de las mismas.

1.2.1. Estructura de las hormonas glicoproteicas

Las HGP están formadas por dos subunidades glicoproteicas diferentes, denominadas α y β , unidas en forma no covalente [74]. Esta estructura heterodimérica es esencial para realizar sus respectivas funciones biológicas [77-79]. Mientras que la subunidad α es común para todas, la subunidad β es específica de cada una de las hormonas y es la que les confiere actividad biológica [80]. Si bien las subunidades β son específicas de cada una, muestran algún grado de homología porque se unen a una subunidad α común. A su vez, existe un factor adicional presente en todas las HGP y es la presencia de un alto

número de puentes disulfuro en ambas subunidades. Hay 10 cisteínas en la subunidad α cuyas posiciones están altamente conservadas entre especies; y hay 12 cisteínas presentes en todas las subunidades β que están altamente conservadas no sólo entre especies, sino también entre las diferentes hormonas [79].

La porción de oligosacáridos en las HGP's representa entre un 20 - 45% de su masa total y ha demostrado ser indispensable para llevar a cabo la actividad biológica *in vivo* [75]. Los residuos de carbohidratos tienen una función dual, aumentan el tiempo de vida media en circulación y desempeñan un papel fundamental en la transducción de la señal después de que la hormona se ha unido a su receptor en las células blanco.

1.2.2. Características de la fracción proteica de las HGP's

Las subunidades α de todas las HGP's están codificadas por un único y mismo gen que se expresa en las células gonadotrópicas hipofisarias y tirotróficas de todos los vertebrados así como en células coriónicas trofoblásticas de la placenta de primates y equinos. Por lo tanto, las subunidades α de todas las HGP's exhiben la misma secuencia de aminoácidos. Las subunidades α comunes en mamíferos, después de la escisión de su péptido señal presentan entre 92 y 96 aminoácidos, de los cuales 10 son residuos de cisteína. Dado que ningún residuo de cisteína está en estado reducido, poseen cinco puentes disulfuro [75]. Varios polimorfismos silenciosos se han descrito en el gen de la subunidad α común, pero ninguno de ellos parece afectar a la secuencia de aminoácidos [81]. A su vez, la secuencia de aminoácidos de las subunidades α de los vertebrados exhiben un alto grado de identidad, evidenciado por el hecho de que es posible recombinar éstas con subunidades β de otras HGP's, inclusive de especies filogenéticamente distantes [82,83].

Por el contrario, las subunidades β , que poseen entre 105 y 150 aminoácidos, son diferentes e inmunológicamente específicas de cada hormona. Así, hay al menos tres genes que codifican subunidades β en todas las especies de vertebrados. Las dos subunidades se cotraducen y se combinan de forma no covalente en el retículo endoplasmático de las células gonadotrópicas (FSH, LH), tirotróficas (TSH) o trofoblásticas (CG). Si bien las subunidades β son específicas de cada hormona, presentan importantes similitudes en sus secuencias. Las secuencias conservadas presentes en las subunidades β han sido consideradas relevantes para (1) la interacción directa con la subunidad α y (2) un plegamiento proteico similar [75]. El análisis de las secuencias de aminoácidos de la subunidad β de diferentes especies permitió determinar

regiones conservadas que podrían ser importantes en el mantenimiento de la estructura secundaria y terciaria, en la interacción entre las subunidades y para la actividad biológica. En particular, el análisis de las secuencias de las subunidades β humanas de TSH, FSH, LH y CG indicaron dos regiones constantes (aa: 316-38 y 56-100) que estarían directamente involucradas en la interacción con las subunidad α común [79]. De esta manera, la homología entre las subunidades β probablemente se deba en gran medida a su característica de asociarse con una subunidad α común.

1.2.3. Características de la fracción oligosacarídica de las HGP

Todas las subunidades de las HGP exhiben una secuencia señal en su extremo N-terminal lo que indica que todas estas moléculas son glicoproteínas de secreción. En mamíferos, entre un 15 y 45% de su masa total corresponde a los oligosacáridos que las integran [75]. Ambas subunidades contienen dos o más secuencias de aminoácidos potenciales de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). La posición y la estructura de los carbohidratos es variada y son fundamentalmente de cuatro tipos: a) neutros, b) sialilados, c) sulfatados y d) mixtos (sulfatados/sialilados) [74,84]. Las fracciones oligosacarídicas no difieren sólo en su grado de sialilación o sulfatación, sino también en el núcleo de sus estructuras [85,86]. La fracción de oligosacáridos de estas hormonas evidencia considerable heterogeneidad, lo cual sumado a la característica macroheterogeneidad da como resultado numerosas glicoformas para cada una de ellas.[87].

1.3. Hormona estimulante de tiroides humana (hTSH)

Como se describió anteriormente, la hormona hTSH es una glicoproteína heterodimérica de 28 kDa, formada por una subunidad α y una subunidad β [80]. Postraduccionalmente, las dos subunidades se combinan y los oligosacáridos conjugados se procesan adicionalmente. La síntesis de una molécula madura de hTSH es compleja y requiere de la escisión de péptidos señal de ambas subunidades α y β , seguido de la adición de residuos de manosa, de moléculas de fucosa, galactosa y ácidos siálicos (Figura 19). Las estructuras de oligosacáridos de TSH varían según si la TSH es de origen hipofisaria o recombinante en células de mamífero o levaduras. Un adecuado patrón de glicosilación de la hormona es necesario para mantener una actividad biológica apropiada [88].

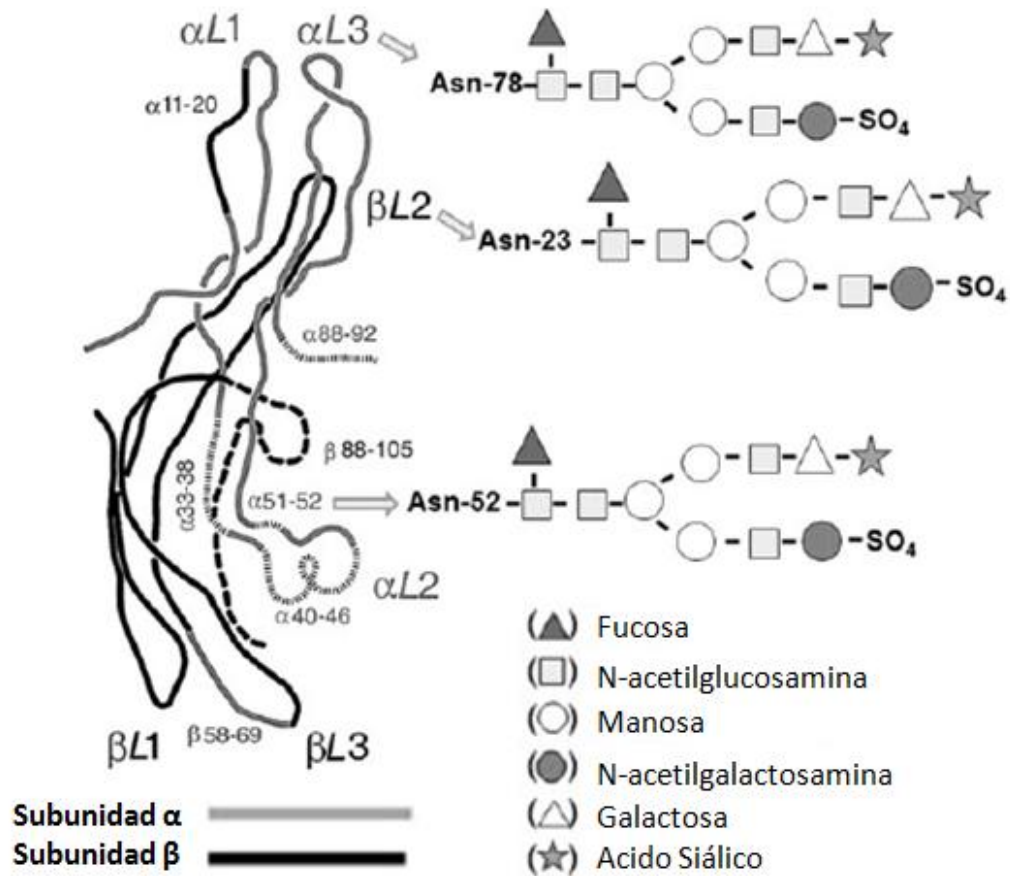


Figura 19: Estructura sugerida de la hormona estimulante de tiroides humana (Figura modificada de Estrada y col., 2014). La hTSH está formada por sus dos subunidades las cuales le otorgan actividad biológica y características inmunológicas específicas. Ambas subunidades contienen ramificaciones de glicano (indicadas con flechas).

2. Objetivos

- 1) *Inmunizar ratones BALB/c con TSH humana nativa (hTSH). Ensayar diferentes protocolos de inmunización con el fin de obtener MAbs de elevada reactividad frente al antígeno. Evaluar la respuesta inmune de los individuos expuestos a los diferentes protocolos de inmunización.*
- 2) *Obtener un panel de MAbs específicos anti-hTSH.*
- 3) *Determinar la especificidad de los MAbs obtenidos frente a toda la familia de hormonas glicoproteicas.*
- 4) *Seleccionar MAbs para su producción y purificación. Evaluar la reactividad de los clones purificados. Caracterizar los anticuerpos seleccionados.*
- 5) *Conjugar químicamente a biotina los MAbs anti-hTSH seleccionados. Evaluar la eficiencia y la reactividad de los MAbs conjugados a biotina.*
- 6) *Estudiar combinaciones de MAbs para el desarrollo de inmunoensayos tipo sandwich en fase sólida para la detección de hTSH.*
- 7) *Evaluar la especificidad de los pares de MAbs en ensayos tipo ELISA sandwich frente a toda la familia de hormonas glicoproteicas.*

3. Materiales y Métodos

3.1. Antígenos hormonales

Las hormonas hipofisarias humanas, hormona estimulante de tiroides (hTSH) y la hormona luteinizante (hLH), y la hormona placentaria gonadotrofina coriónica humana (hCG) fueron obtenidas a través del *National Hormone & Peptide Program*; del *National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases* (NIDDK). La hormona folículo estimulante recombinante (r-hFSH), producida en células CHO y destinada para su uso en bioterapia, fue generosamente provista por Zelltek S.A. (Lot. 110623).

La TSH humana nativa del NIDDK posee un grado de pureza adecuado para los protocolos de obtención de anticuerpos monoclonales. De todas las hormonas se generaron soluciones stock en búfer PBS estéril en concentración de 1 mg/ml y 0,1 mg/ml que luego se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.2. Línea celular de mieloma

NS0: Es una línea celular de mieloma murino (cepa BALB/c), derivado de la línea celular NSI/1.Ag 4.1, no secretor de inmunoglobulinas [89]. Fueron cedidas gentilmente por el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) de la FBCB, UNL.

3.3. Medios de cultivo para hibridomas

- Para la disolución de todos los suplementos de los medios de cultivo se utilizó agua ultra pura (conductividad 18,2 MΩ), obtenida mediante un equipo Milli-Q (Biocel System). Todos los reactivos cuya procedencia no se indican fueron de un grado de pureza analítica.
- El suero fetal bovino (SFB; Bioser) empleado para la suplementación de los medios de cultivo fue previamente descomplementado. Para esto, los recipientes originales de 500 ml se incubaron durante 30 minutos en un baño de agua a 56 °C.
- La preparación de hibridomas se realizó utilizando los siguientes medios de cultivo:
 - A.** D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: 4,5 g/l de D-Glucosa L-Glutamina; 110 mg/l de Piruvato de Sodio 0,11 g/l; Gibco) suplementado con sulfato de gentamicina (Parafarm) 50 µg/ml; Tylosina (Sigma-Aldrich) 8 µg/ml; Pen-Strep-Fungi 100X (Gibco).
 - B.** Medio de cultivo A suplementado con SFB 2,5% V/V.

- C. Medio de cultivo A suplementado con SFB 10% V/V.
- D. Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% V/V y suplemento HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM, aminopterina 400 nM y timidina 0,016 nM.
- E. Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% V/V suplementado con HT (Hipoxantina-Timidina; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM y timidina 0,016 nM.
- F. Medio de cultivo A suplementado con SFB al 20% V/V.

3.4. Mantenimiento de los cultivos de hibridomas

Las líneas celulares empleadas fueron cultivadas en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Thermo Scientific Forma® Series II).

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- A. Placas multipozos de poliestireno (Greiner Bio-One) de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4 - 2 - 5 - 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- B. Frascos T (Greiner Bio-One) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

En todos los casos, se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie [90]. Los cultivos iniciales y los subcultivos siguientes fueron realizados por dilución de alícuotas de suspensiones celulares en el medio de cultivo correspondiente. Los hibridomas y las células NS0 se desarrollan y crecen en suspensión por lo que los subcultivos se efectuaron por simple dilución empleando medio de cultivo fresco.

3.5. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales

Los recuentos se realizaron en cámara de *Neubauer*, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión del azul de tripán [90]. El fundamento de la técnica se basa en que las células muertas presentan un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que permite el ingreso del colorante hacia su interior. La suspensión celular se diluyó convenientemente con la solución de azul de tripán 0,4% P/V en PBS y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente antes de proceder a la carga de la cámara de recuento. Mediante el empleo de esta técnica se determinó, por un

lado, la concentración de células totales (X_T) y por otro, la concentración de células que aparecen coloreadas (células no viables o muertas, X_M). Finalmente, se calculó la concentración de células viables (X_V) y, a partir de este dato, se determinó la viabilidad porcentual del cultivo [$V(\%)$] como se indica en las siguientes ecuaciones:

$$X_T \text{ o } X_M = N^{\circ} \text{ células totales o muertas contadas} \cdot 10^4 \cdot \frac{1}{4} \cdot (\text{dil.})^{-1} \quad (1)$$

$$X_V = X_T - X_M \quad (2)$$

$$X(\%) = X_V / X_T \cdot 100 \quad (3)$$

3.6. Criopreservación de células de mamíferos

La criopreservación es un método de conservación de células que garantiza el mantenimiento de las propiedades metabólicas iniciales de las mismas. La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido empleando una técnica de enfriamiento escalonado, desde temperatura ambiente hasta -196°C . Para la etapa de congelamiento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial y con una viabilidad $\geq 90\%$, se centrifugaron a 200g durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA) (Eppendorf 5810 R). Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en una solución de SFB (Bioser, Argentina) y dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich) en una relación volumétrica 90:10, empleando un volumen adecuado de modo de obtener una concentración de $1\text{-}2 \times 10^6$ células/ml. La suspensión celular se distribuyó en criotubos (Greiner Bio-One) a razón de 1 ml por tubo. El congelamiento se realizó gradualmente mediante la siguiente secuencia de temperaturas: 1 hora a 4°C , 1 hora a -20°C ; 12 horas a -70°C , y finalmente se almacenaron en termos con nitrógeno líquido a -196°C .

3.7. Revitalización de células de mamíferos

Para llevar a cabo la descongelación de las líneas o clones celulares de interés, se retiró el criotubo del termo de nitrógeno y se colocó rápidamente en un baño de agua a 37°C . Inmediatamente, la suspensión celular se agregó a un tubo estéril que contenía 40 ml de medio de cultivo A, se homogeneizó y la suspensión se centrifugó a 200g durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó para eliminar el DMSO, el cual

es tóxico para las células en cultivo. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en un volumen adecuado de medio de cultivo.

3.8. Obtención de hibridomas productores de MAbs anti-hTSH

La metodología para la preparación de hibridomas fue llevada a cabo siguiendo esencialmente la técnica descrita por Galfré y Milstein en el año 1981 [89].

A. Inmunización de ratones

Todos los protocolos de inmunización se realizaron con ratones BALB/c, machos, de 8 semanas de edad al momento de la primera exposición al antígeno (hTSH). Se ensayaron diferentes protocolos con los cuales se realizaron distintos eventos de fusión celular para la obtención de anticuerpos específicos.

Como se describe en la Tabla 1, se utilizaron masas de inmunización comprendidas entre 2,5 y 25 $\mu\text{g/ratón}$, con frecuencias de inoculación y períodos de descanso variables. Todos los eventos de inmunización se realizaron por vía intraperitoneal (IP), emulsionando en la primera exposición al antígeno con igual volumen de adyuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich). Los refuerzos sucesivos se realizaron con el antígeno emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich), vía IP. Por otro lado, con el objetivo de inducir la expresión selectiva de los clones de alta afinidad se evaluaron protocolos con períodos más prolongados de maduración de la afinidad (6 y 9 meses), combinado con refuerzos con bajas dosis de antígeno diluido sólo en PBS (5 $\mu\text{g/dosis}$).

En cada caso, dentro de los 10 días posteriores al último refuerzo (*booster*), se realizó un ensayo de ELISA específico indirecto para la determinación del título de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados. El título fue calculado como la máxima dilución cuya absorbancia ($\lambda = 450 \text{ nm}$) superara en tres desviaciones estándar el valor de la absorbancia del correspondiente control negativo (suero de ratones preinmunizados). En todos los casos, tres días previos a la fusión, el animal fue reestimulado (*booster*) por vía IP con el antígeno disuelto sólo en PBS. Tres días después se sacrificaron los animales y las células del bazo se utilizaron para la fusión.

Tabla 1: *Protocolos de inmunización. Esquema de inmunización utilizado para la obtención de anticuerpos específicos anti-hTSH. Los distintos protocolos ensayados fueron diseñados para evaluar distintas masas de exposición al antígeno, frecuencias de inoculación y periodos de descanso variables.*

	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D	Protocolo E		Protocolo F	
Primer dosis (μg)	2,5 μ g hTSH	10 μ g hTSH	25 μ g hTSH	5 μ g hTSH	20 μ g hTSH		20 μ g hTSH	
Refuerzos (μg)	2,5 μ g hTSH	10 μ g hTSH	25 μ g hTSH	5 μ g hTSH	20 μ g hTSH		5 μ g hTSH	
Frecuencia (Nro. Inoc)	c/21 días (3)	c/21 días (3)	c/21 días (3)	c/7 días (3)	c/7 días (3)	c/21 días (3)	c/7 días (4)	c/21 días (4)
Periodo de descanso	3 - 5 meses			5 - 6 meses			6 - 9 meses	

B. Preparación de una capa de células alimentadoras (*feeder layer*)

El desarrollo de hibridomas requiere condiciones óptimas de cultivo celular, es decir, el aporte de nutrientes y factores de crecimiento que permitan a la célula híbrida iniciar su proliferación. Por ello, además de los nutrientes presentes en los medios de cultivo formulados, se empleó SFB en una concentración del 20% V/V y una capa de células alimentadoras que se preparó a partir de un bazo de ratón de la cepa BALB/c. La presencia de estas células incrementa las posibilidades de crecimiento de hibridomas cuando se encuentran en muy bajas densidades celulares tal como ocurre en la etapa de fusión y clonado celular. Además, su empleo es esencial para favorecer el desarrollo de aquellos híbridos de fusión que demuestran severas dificultades en el crecimiento.

La preparación de la capa de células alimentadoras o *feeder layer* se realizó 24 horas antes de la fusión y se llevó a cabo de la siguiente manera: un ratón de la cepa BALB/c, se sacrificó por dislocación cervical y en condiciones estériles se extrajo el bazo. Éste se lavó con 20 ml de medio de cultivo B, se disgregó mediante el empleo de tijera y se filtró por un tamiz de malla fina. El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 200g, y luego de descartar el sobrenadante, las células del bazo se resuspendieron en 100 ml de medio de cultivo D (para el procedimiento de fusión) ó E (para el procedimiento de clonado). Posteriormente, las células extraídas se sembraron en placas de 96 pozos a razón de 100 μ l/pozo.

C. Células de mieloma

Se emplearon células NS0, mieloma no secretor de inmunoglobulinas, obtenido a partir de la cepa BALB/c, cultivadas en medio de cultivo C libre de antibióticos. Las células, en fase de crecimiento exponencial, se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo B. La viabilidad, determinada por método de exclusión de azul de tripán, fue mayor a 90%.

D. Fusión celular

En cada caso, los ratones hiperinmunes se sacrificaron por dislocación cervical y en condiciones de esterilidad se extrajo el bazo. Este órgano se lavó con medio de cultivo B, se disgregó con tijera y el producto de la disgregación se filtró por un tamiz de malla fina. El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 200g y las células se resuspendieron en 25 ml de medio B. Posteriormente, estas se adicionaron a una suspensión de células NS0 en una proporción 10:1. Los ensayos de fusión se realizaron empleando polietilenglicol (PEG 3350; Sigma-Aldrich) al 50% P/V en PBS estéril. Luego, la mezcla se diluyó gradualmente mediante el agregado de medio de cultivo A, se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 200g y las células se resuspendieron en 100 ml de medio D. Finalmente, esta suspensión celular se dispensó a razón de 100 µl/pozo en las placas previamente acondicionadas con las células alimentadoras (*feeders layers*).

E. Selección de hibridomas productores de anticuerpos específicos

El método de selección de hibridomas es un medio de cultivo celular con hipoxantina y timidina, al que se le agrega aminopterina como inhibidor de la síntesis *de novo* de purinas. En estas condiciones sólo sobreviven aquellas células que expresen la enzima HGPRT.

Antes de realizar la experiencia de fusión celular, se evaluó el reactivo de selección (HAT) y la capacidad de resistencia a aminopterina de las células de mieloma. Para ello, un cultivo de mieloma en fase de crecimiento exponencial fue subcultivado en frasco T (de 25 cm² de superficie) en una concentración de 100.000 células/ml en medio de cultivo D (HAT). Las células cultivadas de esta manera demostraron 100% de mortalidad a los 5 días.

Debido a que las células de mieloma no sobrevivieron luego de 5 días de exposición a aminopterina, se seleccionó el día 6 posterior a la fusión celular para renovar el medio selectivo de cultivo. El mismo se realizó reemplazando la mitad del volumen de cada pozo, por medio de cultivo D para incrementar la selección de las células híbridas. El crecimiento y el desarrollo de las colonias resultantes de la selección fueron rutinariamente observadas al microscopio invertido.

Entre 7 y 15 días posteriores a la fusión fue posible observar el crecimiento de los hibridomas formando colonias discretas. Cuando alcanzaron un tamaño adecuado se

procedió a monitorear la presencia anticuerpos específicos anti-hTSH mediante ELISA específico indirecto.

F. Determinación de la presencia de anticuerpos específicos anti-hTSH en sobrenadante de cultivos o en suero de ratones inmunizados por ELISA Específico Indirecto.

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo del antígeno hTSH en una concentración de 0,5 µg/ml diluido en solución de carbonato/bicarbonato de sodio 50 mM, pH = 9,6 (Solución de Sensibilización). Se incubó toda la noche (ON) a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de solución de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) al 1% P/V en PBS pH = 7,5 (PBS-BSA; Solución de Bloqueo). Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Muestras: se agregaron 100 µl/pozo de cada sobrenadante de cultivo de hibridomas sin diluir o diluciones 1/2 de plasma de ratones inmunizados en PBS - BSA 1% P/V - Tween 20 (Sigma-Aldrich) 0,05% V/V (PBS-BSA-T; Solución Diluyente) para determinar el título de anticuerpos. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Primario: Se agregaron 100 µl/pozo de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (ISAL; FBCB; UNL), diluido 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Revelado: comprende la reacción enzimática que emplea como sustrato cromogénico 3-3'-5-5'-tetrametilbenzidina (TMB; Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensaron 100 µl/pozo de TMB. Se incubó en oscuridad y a TA. Luego de 5 – 15 minutos la reacción colorimétrica se detuvo con 100 µl/pozo con Solución *Stop* (H₂SO₄ 12%). La lectura del color generado se efectuó a $\lambda = 450$ nm en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).
- 6) Controles: (-) medio de cultivo o plasmas basales (ratones no inmunizados).

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución PBS-Tween 20 0,05% P/V (PBS-T; Solución de Lavado).

G. Clonado de hibridomas productores de anticuerpos específicos

El objetivo principal del clonado es aislar clones que producen MAb's con distinta especificidad y afinidad, seleccionando aquellos híbridos que producen anticuerpos de manera estable. Como regla general, lo mejor es realizar el clonado lo antes posible, dado que múltiples clones compiten en un mismo cultivo por su crecimiento y ésto, en conjunto con la segregación de cromosomas, puede desestabilizar la expresión de una línea dada de hibridoma.

Este procedimiento se llevó a cabo por el método de dilución límite (DL) [91,92]. Con este fin, los hibridomas se resuspendieron en medio de cultivo E preparando suspensiones celulares cuyas concentraciones fueron 0,5 células/ml, 5 células/ml y 50 células/ml. En dos placas de 96 pozos, divididas cada una en 3 regiones, se sembró cada suspensión de hibridomas en un sector diferente. Se dispensaron 200 µl por pozo de manera que la placa quedó configurada por 3 sectores conteniendo en promedio 0,1 célula por pozo (es decir, 1 célula cada 10 pozos), 1 célula por pozo y 10 células por pozo, respectivamente. El clonado se consideró efectivo cuando se observó hasta un 33% de crecimiento en los pozos correspondientes a la siembra de 1 y 0,1 células por pocillo. Posteriormente, se determinó el número de clones visualizados por cavidad y cuando éstos llegaron a una densidad adecuada se investigó la presencia de anticuerpos anti-hTSH por técnica de ELISA específico indirecto. Los clones que demostraron reacción positiva por ELISA fueron expandidos gradualmente y finalmente almacenados en nitrógeno líquido.

3.9. Determinación de la especificidad de los MAb's por ELISA Indirecto

La detección de la hormona en suero humano requiere el uso de anticuerpos específicos que permitan evitar posibles reacciones cruzadas. Por esta razón, durante el proceso de aislamiento y selección de clones específicos, aquellos clones que en primera instancia demostraron reacción positiva contra hTSH por ELISA específico indirecto, fueron expandidos gradualmente y reevaluados con la misma metodología frente a toda la familia de glicohormonas (hTSH, r-hFSH, hLH y hCG). De esta manera, los distintos anticuerpos monoclonales obtenidos fueron clasificados y agrupados en función del reconocimiento de determinantes antigénicos compartidos o no entre las distintas hormonas utilizadas para el *screening*.

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 50 ng/pozo de cada uno de los antígenos glicoproteicos

(hTSH, r-hFSH, hLH y hCG) diluidos en solución de sensibilización. Se incubó ON a 4 °C.

- 2) Bloqueo: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 2.
- 3) Anticuerpo Primario: se agregaron 100 µl/pozo de cada sobrenadante de cultivo de hibridomas. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 4.
- 5) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.
- 6) Controles: (-) medio de cultivo; (-) búfer de dilución de anticuerpos.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

3.10. Producción *in vitro* y purificación de MAbs anti-hTSH seleccionados.

Con el fin de obtener sobrenadante de cultivo de hibridomas, aquellos clones que fueron seleccionados se expandieron y cultivaron en medio C. Los cultivos iniciales y cultivos subsiguientes se realizaron en modo *batch*, a escala de laboratorio, en frascos T de 175 cm². Una vez que los hibridomas alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento, se centrifugó la suspensión celular a 200g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue acondicionado para su almacenamiento a -20 °C y posterior purificación por cromatografía de afinidad.

3.10.1 Purificación de MAbs por cromatografía de afinidad a proteína G

Los MAbs anti-hTSH presentes en el sobrenadante de cultivo fueron purificados utilizando una columna de 5 ml de matriz comercial de proteína G (Hi-Trap rProtein G FF; GE, Healthcare) y una bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson). La proteína G (aislada originalmente de estreptococos G) se une a la región Fc de IgG murinas (IgG₁; IgG_{2a}; IgG_{2b}; IgG₃) con elevada afinidad. La cromatografía de afinidad a proteína G es una opción muy útil para la purificación de inmunoglobulinas por las siguientes características: la interacción de los anticuerpos con esta proteína no modifica la capacidad de interaccionar con el antígeno, la proteína G es muy resistente a condiciones desnaturalizantes, y a pesar de poseer una alta afinidad por el anticuerpo,

dicha interacción puede romperse en condiciones de pH extremas. El protocolo general de purificación se describe a continuación:

- 1) Equilibrado: la columna se equilibró con 10 volúmenes de PBS pH = 7,5 a una velocidad máxima de 5 ml/minuto.
- 2) Acondicionamiento de la muestra: la metodología para la preparación de la muestra fue puesta a punto en el laboratorio siguiendo esencialmente los siguientes pasos: se centrifugó el medio crudo a 4.000 rpm (10 minutos a TA). Se retuvo el sobrenadante y se diluyó al ½ en PBS pH = 7,5 y posteriormente se dejó clarificar en agitación, en baño de hielo, 1 hora. El medio clarificado fue nuevamente centrifugado (4.000 rpm, 10 minutos), se retuvo el sobrenadante. El producto obtenido, previo a ser pasado por la columna cromatográfica, se filtró utilizando unidades filtrantes de 0,22 µm de tamaño de poro (Gamafil).
- 3) Siembra: la muestra se sembró a un flujo máximo de 5 ml/min.
- 4) Lavado: las proteínas no retenidas por la matriz se lavaron con 10 volúmenes de solución de PBS pH = 7,5, al mismo flujo de siembra, hasta demostrar la ausencia de proteínas por medida de la absorbancia a $\lambda = 280$ nm en espectrofotómetro (BioPhotometer Plus, Eppendorf).
- 5) Elución de las inmunoglobulinas: se realizó por descenso de pH. Se empleó una solución de glicina 0,1 M, pH = 2,8. Se recogieron alícuotas de 1 ml en neutralizadas inmediatamente con 200 µl de Tris pH = 9,0.

Las fracciones correspondientes al pico de elución de inmunoglobulinas fueron mezcladas y la concentración final de MAbs fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm. Se determinó que una unidad de absorbancia de una solución de inmunoglobulinas murinas equivale a una concentración de 0,8 mg/ml de anticuerpo puro, basado en la literatura [93] y en lecturas propias de una solución patrón de Ig comercial.

3.10.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Extractos de los anticuerpos purificados se evaluaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 15%, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (PAGE-SDS) y posterior tinción con el colorante azul de Coomassie

(Thermo-Fischer Scientific). Se sembraron 20 µg de proteínas por calle. En cada corrida, se sembró también un patrón de peso molecular (ECL Rainbow Marker - Full range, GE Healthcare). Las muestras fueron diluidas en búfer en presencia de SDS y β-mercaptoetanol. Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos en baño de agua a 95 °C y sembradas en gel de apilamiento.

3.11. Caracterización inmunoquímica

La caracterización inmunoquímica se llevó a cabo por determinación de las variedades isotópicas de las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas murinas por técnicas de ELISA específico indirecto.

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de hTSH en una concentración de 0,5 µg/ml diluido en solución de sensibilización. Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 2.
- 3) Anticuerpo Primario: se agregaron 100 µl/pozo de sobrenadante de cultivo de clones seleccionados empleando 8 pozos por placa para cada muestra (corresponde un pozo para cada isotipo murino cadena pesada y liviana). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario: cada muestra se incubó con 100 µl de anticuerpos de conejo anti-isotipos murinos diluidos 1:1.000 en PBS. Se ensayó un pozo de muestra por cada anti-isotipo IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgM, κ y λ (Bio-Rad). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Anticuerpo Terciario: cada muestra se incubó con 100 µl de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) diluidos 1:1.000 con solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 6) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.
- 7) Controles: (-) medio de cultivo; (-) búfer de dilución de anticuerpos.

3.12. Estimación de la constante de afinidad (K_{aff}) aparente

La estimación de la constante de afinidad aparente de los MABs seleccionados se realizó por inmunoensayos enzimáticos no-competitivos, descrito por Beatty y col. [94]. Este método describe la determinación de la K_{aff} de anticuerpos monoclonales utilizando los valores de lectura correspondientes al 50% de las absorbancias máximas obtenidas (UA-50) en las curvas sigmoideas de respuesta. El método se basa en la ley de Acción de Masas y utiliza la concentración total de anticuerpos agregados por pocillo $[Ab]$, en lugar de la fracción libre.

Para emplear este método de estimación de la K_{aff} se debe asumir que:

1. La interacción antígeno-anticuerpo está regulada por la Ley de Acción de Masas.
2. La reacción alcanza el equilibrio.
3. La adsorción del antígeno en fase sólida no altera el equilibrio.
4. La cantidad de antígeno adsorbido es proporcional a la concentración del antígeno en la solución de sensibilización y que ésta es constante.
5. La cantidad de antígeno adsorbido en la placa es la concentración del antígeno medida por las derivaciones matemáticas de la Ley de Acción de Masas.
6. La proporción de antígeno remanente en el búfer de sensibilización no afecta la constante de afinidad del anticuerpo.
7. No hay efecto de cooperación entre los distintos sitios de unión al antígeno presentes en el anticuerpo.

Brevemente, se sensibiliza una microplaca de titulación con diluciones seriadas del antígeno (Ag) y posteriormente se incuba con un gradiente de concentraciones del anticuerpo monoclonal (Ab). Finalmente, se incuba con un segundo anticuerpo o conjugado enzimático para producir la reacción colorimétrica. La cantidad de Ab unido al Ag en fase sólida $[Ag\ Ab]$ y $[Ag_2\ Ab]$ se pone en evidencia por la reacción colorimétrica medida en unidades de absorbancia (UA). El uso de diluciones sucesivas del Ab da lugar a una curva sigmoidea de UA versus el logaritmo de Ab total añadido para cada una de las concentraciones de antígeno ensayadas. $[Ab]_t$ y $[Ab']_t$ son las masas de anticuerpo que se corresponden con el 50% de la lectura UA máxima de sus correspondientes curvas sigmoideas (UA-50 y UA-50'), para los pocillos sensibilizados con $[Ag]$ y $[Ag']$ respectivamente.

La Ley de Acción de Masa para dos sitios de unión (sin efecto cooperativo) de un anticuerpo monoclonal se expresa como:

$$K_{aff} \approx K_1 = K_2 \quad (4)$$

Por lo que:

$$K = \frac{[Ag Ab]}{2[Ag][Ab]} = \frac{2[Ag_2 Ab]}{[Ag][Ag Ab]} \quad (5)$$

Donde K es la constante de afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo en l/mol (M⁻¹); [Ag] es la concentración del antígeno libre (M); [Ab] es la concentración del anticuerpo libre y que posee dos sitios de unión al antígeno 2[Ab] (M); [Ag Ab] es la concentración del antígeno unido al anticuerpo (M); [Ag₂ Ab] es la concentración del anticuerpo unido a dos moléculas de antígeno. Las derivaciones matemáticas que se realizan a partir de la ecuación antes mencionada convierten la Ley de Acción de Masas en una ecuación que utiliza la concentración total del anticuerpo en la mezcla de reacción [Ab]_t. Estas derivaciones matemáticas permiten el cálculo de K_{aff} aparente del anticuerpo [94].

Las UA en cualquier punto de la curva de dilución (sigmoidea) de UA versus el logaritmo de [Ab] es una reflexión directa de la cantidad de anticuerpo unido al antígeno en el pocillo ([Ag Ab] + [Ag₂ Ab]). El 50 % de la lectura UA máxima (100%, UA-100), UA-50, la cantidad de anticuerpo unido al antígeno en el pocillo es la mitad de la cantidad de anticuerpo unida a UA-100. Resolviendo una serie de ecuaciones se llega a la forma simplificada para el cálculo de la K_{aff}:

$$K_{aff} = 1/2 (2[Ab']_t - [Ab]_t) \quad (6)$$

La ecuación es una estimación de la constante de afinidad de la interacción antígeno-anticuerpo que se basa únicamente en la concentración total de anticuerpos a UA-50

para pocillos sensibilizados con dos cantidades de antígeno ($[Ag]$ y $[Ag']$, siendo una masa de sensibilización la mitad de la otra.

Los ensayos de ELISA específico indirecto para estimar la K_{aff} de los MAb's seleccionados, se realizaron como se describe a continuación:

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con hTSH en concentraciones de 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$, diluida en solución de sensibilización. Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 μl /pozo de solución de BSA (Sigma-Aldrich) al 1% P/V en PBS pH = 7,5. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Anticuerpo Primario: se agregaron 100 μl /pozo de diluciones seriadas de los MAb's purificados en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario: Se agregaron 100 μl /pozo de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (ISAL; FBCB; UNL) diluido 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.
- 6) Controles: (-) sin anticuerpo primario. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

3.13. Acoplamiento de MAb's a biotina

La metodología desarrollada para la preparación de conjugados con biotina fue puesta a punto en el laboratorio.

- 1) Se preparó una solución de 15 mg/ml de biotina activada (EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo Scientific) en H_2O_{dd} estéril.

- 2) Todos los MAbs purificados se llevaron a una concentración final de 1mg/ml en PBS (pH = 7,5) para su utilización y/o almacenamiento a -20 °C. Para esto se utilizó la técnica de ultrafiltración, empleando los dispositivos UltrafreeTM Amicon (Millipore) con membranas de 30 kDa de límite de exclusión de proteínas. La concentración de anticuerpos fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm. Los MAbs seleccionados para su conjugación a biotina fueron fraccionados a 1 ml, en una concentración final de 1 mg/ml.
- 3) Posteriormente, se adicionó 100 μ l solución de biotina a la solución del MAb, de manera de establecer una relación de 150 μ g de biotina por cada mg de anticuerpo. Se incubó durante 4 horas con agitación a temperatura ambiente.
- 4) Luego de la etapa de conjugación con biotina propiamente dicha, se realizó un cambio de búfer a PBS pH = 7,5 (UltrafreeTM Amicon 30.000; Millipore) para eliminar el exceso de biotina. Los MAbs biotinilados se conservaron en PBS – Azida Sódica a 4 °C y al resguardo de la luz.
- 5) La titulación de los MAbs biotinilados se efectuó empleando la técnica de ELISA específico indirecto.

A. Evaluación de los MAbs purificados y titulación de MAbs biotinilados por ELISA específico indirecto

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de cada antígeno hormonal (hTSH, r-hFSH, hLH y hCG) en una concentración de 0,5 μ g/ml diluido en Solución de Sensibilización. Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 μ l/pozo de Solución de Bloqueo. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Anticuerpo Primario: se agregaron 100 μ l/pozo de diluciones seriadas de los MAbs purificados o MAbs conjugados a biotina, en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario: Se agregaron 100 μ l/pozo de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (ISAL; FBCB; UNL) o de estreptavidina conjugada a la misma enzima (STV-HRP,

Sigma-Aldrich) diluidos 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.

- 5) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.
- 6) Controles: (-) sin anticuerpo primario. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

3.14. Estudio de MAbs aptos para el desarrollo de inmunoensayos tipo *sandwich*

Para el desarrollo de inmunoensayos de captura de antígeno se realizó una selección de MAbs basado en la especificidad y en la constante de afinidad (K_{aff}) de los mismos. El estudio de compatibilidad entre los distintos pares de MAbs se realizó por ELISA *sandwich* indirecto, evaluando cada uno de ellos tanto como anticuerpo de captura, como anticuerpo de detección (conjugado a biotina) frente al resto de los MAbs seleccionados siguiendo el esquema mostrado en la Figura 20.

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de cada MAbs anti-hTSH seleccionado (1 – 10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Antígeno: se agregaron 100 µl/pozo de hTSH 1 µg/ml diluida en solución diluyente (PBS-BSA-T). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 µl/pozo de cada MAbs anti-hTSH biotinilado (1 – 10 µg/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 6) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.

- 7) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
 (-) sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

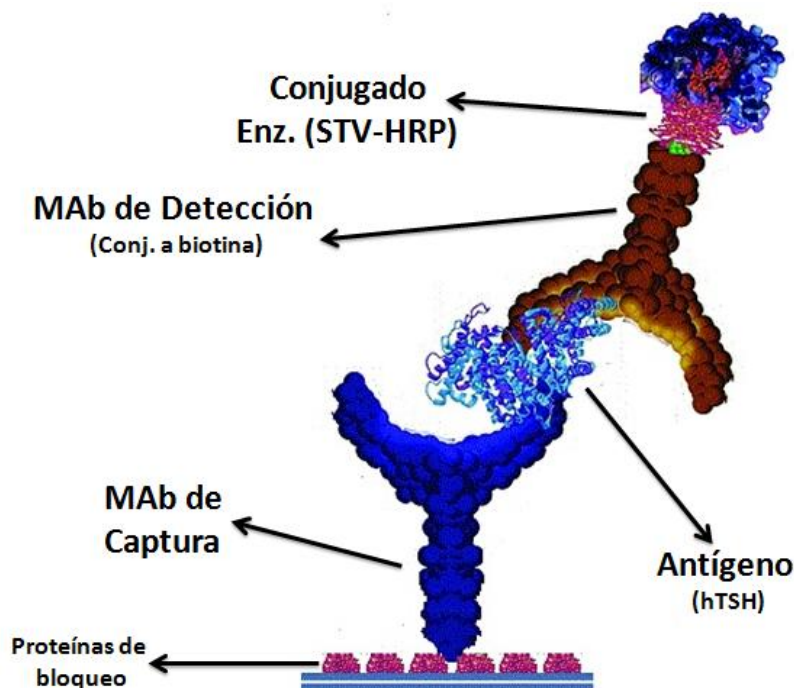


Figura 20: ELISA sandwich anti-hTSH. Esquema general de los ensayos de ELISA sandwich indirecto para el estudio de combinaciones de MAb para captura de hTSH. Los MAb seleccionados fueron evaluados tanto como MAb de captura como de detección (conjugado a biotina).

3.15. Evaluación de la especificidad de los pares de MAb

Se estudió la potencial reacción cruzada con las demás hormonas glicoproteicas (hTSH, r-hFSH, hCG and hLH) de cada uno de los pares de MAb seleccionados, y en comparación con kit comercial (U-TSH EIAgen Kit, Adaltis), en ensayos de ELISA sandwich.

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de cada MAb anti-hTSH seleccionado (10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.

- 3) Antígeno: se agregaron 100 µl/pozo de cada antígeno (hTSH; r-hFSH, hLH y hCG) en una concentración de 1 µg/ml en solución diluyente. Se incubó durante 1 a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 µl/pozo de cada MAbs anti-hTSH biotinilado (1 – 10 µg/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 6) Revelado: ídem procedimiento indicado en el punto 3.8, inciso F, etapa 5.
- 7) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
(-) sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

4. Resultados y Discusión

4.1. Evaluación de la respuesta inmune frente a hTSH

La respuesta inmune de los ratones BALB/c inmunizados con hTSH nativa (NIDDK) fue evaluada, en cada caso, dentro de los diez días posteriores al último refuerzo. Como se observa en la Tabla 2, el título de anticuerpos específicos en el suero de los ratones inmunizados osciló entre 1:128.000 y 1:1.024.000 considerándose, en todos los casos, aptos para la producción de hibridomas.

Tabla 2: Títulos de anticuerpos específicos en muestras de suero de los ratones inmunizados. Los distintos protocolos ensayados fueron diseñados para estudiar distintas masas de exposición al antígeno, frecuencias de inoculación y períodos de descanso variables. Para cada condición se muestra el título de anticuerpos obtenido dentro de los 10 días posteriores a la finalización de cada protocolo.

	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D	Protocolo E		Protocolo F	
Primer dosis (µg)	2,5 µg hTSH	10 µg hTSH	25 µg hTSH	5 µg hTSH	20 µg hTSH		20 µg hTSH	
Refuerzos (µg)	2,5 µg hTSH	10 µg hTSH	25 µg hTSH	5 µg hTSH	20 µg hTSH		5 µg hTSH	
Frecuencia (Nro. Inoc)	c/21 días (3)	c/21 días (3)	c/21 días (3)	c/7 días (3)	c/7 días (3)	c/21 días (3)	c/7 días (4)	c/21 días (4)
Periodo de descanso	3 - 5 meses			5 - 6 meses			6 - 9 meses	
Título en suero	1:128.000		1:1.024.000	1:256.000 - 1:512.000			1:512.000 - 1:1.024.000	

Los títulos más altos se obtuvieron en los ratones BALB/c expuestos a protocolos con períodos de descanso comprendidos entre 6 - 9 meses y refuerzos con bajas dosis de antígeno. Los títulos alcanzados finalmente fueron de 1:512.0000 y 1:1.024.000 respectivamente.

4.2. Fusión celular y obtención de clones productores de MAbs específicos

Se seleccionaron ratones hiperinmunes de los distintos protocolos de inmunización y se llevaron a cabo sucesivos eventos de fusión celular. En todos los casos, tres días antes de cada fusión, los animales se reestimularon (*booster*) con el antígeno disuelto en PBS. De las distintas fusiones que involucraban protocolos de períodos de descanso de entre 2 y 5 meses (Protocolos A, B y C), se obtuvieron 76 líneas de hibridomas y se seleccionaron y criopreservaron 72 clones productores de anticuerpos específicos (Tabla 3). Las fusiones realizadas con ratones con títulos menores a 1:128.000 (protocolos A y B) no fueron satisfactorios: en un caso no se detectaron líneas positivas y en otras dos fusiones posteriores la cantidad de líneas positivas fue considerablemente baja. Algo

similar ocurrió con ratones del Protocolo D (baja masa de inoculación, 6 meses de descanso). Probablemente, las masas de inmunización utilizadas (2,5 - 10 μ g/inoculación), la frecuencia de inoculación y períodos para la maduración de la afinidad inferiores a los seis meses fueron insuficientes para lograr buenos rendimientos en estos ensayos de fusión. A su vez, los títulos de los animales de los protocolos A, B y D fueron siempre inferiores a 1:256.000, lo que muestra algún grado de dificultad adicional para el aislamiento de líneas específicas.

Tabla 3: Líneas de hibridomas obtenidas en cada uno de los ensayos de fusión celular. Sólo en un caso (protocolo A, título 1:128.000) no se retirieron líneas productoras de anticuerpos específicos.

	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D	Protocolo E	Protocolo F
Fusiones	1	2	2	1	2	2
Líneas	-	3	73	2	23	> 50
Clones	-	1	71	2	17	50

En cambio, con los ratones expuestos a masas de inoculación iguales o mayores a 20 μ g o con períodos de inmunización más prologados (6 - 9 meses), se obtuvieron más de 100 líneas productoras de anticuerpos específicos, a partir de las cuales se aislaron y seleccionaron más de 100 clones productores de anticuerpos monoclonales anti-hTSH (Protocolos C, E y F).

4.3. Obtención de clones específicos y determinación de la especificidad

En cada ensayo de fusión, las líneas de hibridomas que presentaron características favorables de reactividad, proliferación y desarrollo, fueron seleccionadas para el aislamiento de clones de interés. Este procedimiento se llevó a cabo por el método de DL de las líneas seleccionadas y posterior *screening* de clones específicos por ELISA indirecto anti-hTSH. Se hicieron stocks de todos los clones y de sobrenadantes de cultivo que fueron debidamente acondicionados y almacenados (-20 °C) para su eventual purificación por cromatografía de afinidad a proteína G.

Posteriormente, los clones seleccionados y aislados en cada ensayo de fusión se clasificaron, por ELISA indirecto, en función del reconocimiento de determinantes antigénicos compartidos entre las distintas hormonas relacionadas (hTSH, r-hFSH, hLH,

hCG). Como se muestra en la Figura 21, el panel de aproximadamente 100 anticuerpos se dividió en tres grupos: MAbs α -específicos (MAbs α); MAbs β -específicos (MAbs β) y MAbs $\beta_{(\alpha)}$ -específicos (MAbs $\beta_{(\alpha)}$). Definimos a los MAbs α -específicos como aquellos que se unen en forma indistinta a las cuatro hormonas estructuralmente relacionadas. En contraposición, denominamos MAbs β -específicos a aquellos anticuerpos que sólo reconocen al antígeno hTSH y no se unen al resto de las hormonas evaluadas. La ausencia de reactividad cruzada con las otras hormonas glicoproteicas sugiere que los MAbs β están dirigidos contra determinantes antigénicos de la subunidad β de hTSH y no contra la subunidad α común para las cuatro hormonas [95]. Finalmente, los denominados $\beta_{(\alpha)}$ -específicos son aquellos que reconocen la hTSH pero también presentan reacciones intermedias frente a una o más de las otras hormonas evaluadas (r-hFSH, hLH y hCG). Consideramos que estos anticuerpos probablemente se unen a regiones con características conformacionales o a determinantes antigénicos parcial o totalmente compartidos [96,95]. En este sentido se ha descrito la existencia de cierta homología entre las subunidades β de estas glicoproteínas, principalmente alrededor de los residuos de cisteína [79,84,75]. En efecto y como se muestra en la Figura 22, la secuencia de aminoácidos de las subunidades beta de las hormonas glicoproteicas poseen cierta homología.

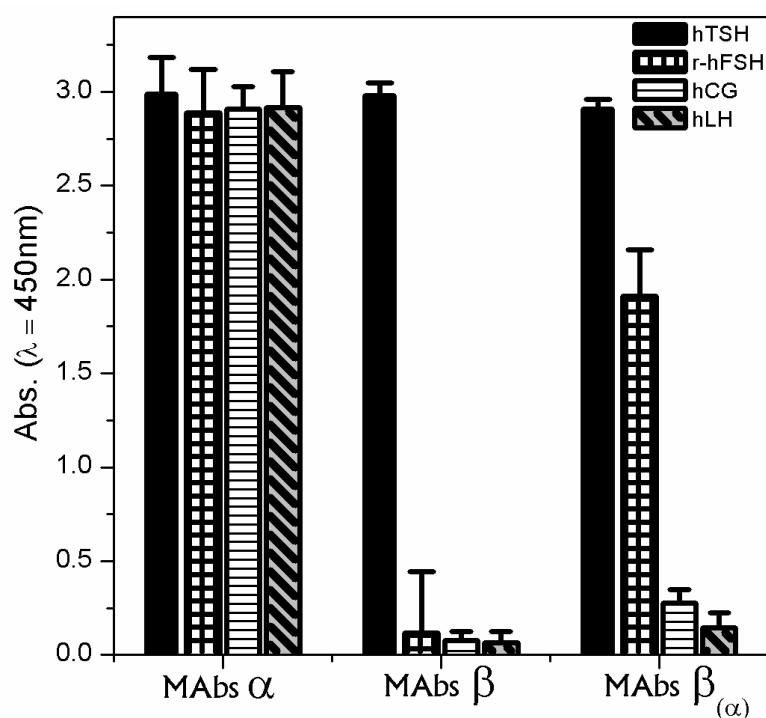


Figura 21: Clasificación de MAbs anti-hTSH. La clasificación se realizó a partir de inmunoensayos frente a la familia de hormonas glicoproteicas: hTSH; r-hFSH; hCG y hLH.

En la Figura 22 se muestran los alineamientos de las secuencias de aminoácidos utilizando el *software* Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA) a partir de las secuencias de acceso libre disponibles en *UniProt* (<http://www.uniprot.org>). Cada una de las secuencias de aminoácidos de las subunidades beta de las hormonas FSH (P01225), LH (P01229) y CG (P0DN86) humanas fue alineada y comparada con la secuencia de aminoácidos de la subunidad beta de TSH humana (P01222). Se muestran en amarillo los residuos idénticos, y en verde los residuos similares o relacionados fisicoquímicamente.

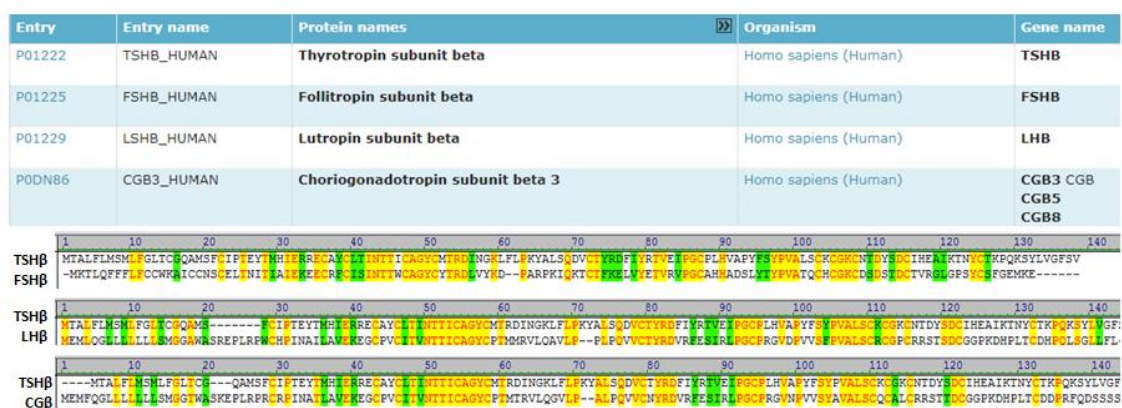


Figura 22: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades beta humanas de las hormonas FSH, LH y CG con TSH. En amarillo se resaltan los aminoácidos idénticos compartidos con TSH y en verde los residuos similares.

En todos los casos, las subunidades betas mostraron al menos un 30% de residuos compartidos, así como al menos un 30 de ellos se ubican en posiciones idénticas (Figura 22). Este importante grado de homología entre las subunidades beta específica de cada hormona se debería a que se unen una subunidad alfa común y porque las subunidades beta poseen secuencias conservadas relevantes para un plegamiento proteico similar [79,84,75]. Esto explica, al menos en parte, porque de los 141 clones totales obtenidos, sólo una fracción menor fueron específicos para la subunidad beta de TSH, mientras que la gran mayoría (>100) mostró reacción cruzada con una o más de las otras hormonas glicoproteicas evaluadas.

4.4. Selección y purificación de MAbs anti-hTSH

Se seleccionaron y expandieron 43 clones productores de MAbs específicos de cada uno de los grupos MAbs α , MAbs β y MAbs $\beta_{(\alpha)}$. Los cultivos iniciales y subcultivos siguientes se realizaron en modo *batch*, a escala de laboratorio, hasta frascos T de 175

cm². Los sobrenadantes de cultivo fueron purificados por cromatografía de afinidad a proteína G. La absorbancia de las alícuotas fue registrada en espectrofotómetro ($\lambda = 280$ nm) y aquellas fracciones con inmunoglobulinas fueron mezcladas, homogeneizadas y llevadas a una concentración final de 1 mg/ml. Luego de cada proceso de purificación, los anticuerpos fueron analizados por SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 23), y por titulación mediante ELISA específico indirecto (Figura 24).

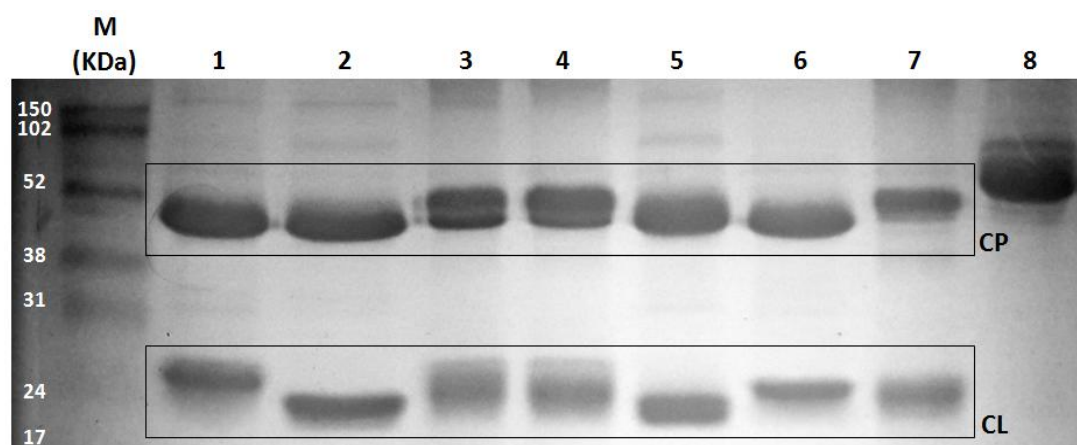


Figura 23: Evaluación de MAbs purificados por cromatografía de afinidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. M: marcador de peso molecular; 1-7: extractos de anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad a proteína G; 8: sobrenadante de cultivo previo al proceso de purificación; CP: cadenas pesadas (50 kDa); CL: cadenas livianas (25 kDa).

En la Figura 23 se muestra el SDS-PAGE de una parte del total de anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad (calles 1-7), en comparación con un marcador de peso molecular y con sobrenadante cultivo previo al proceso de purificación (calle 8). Para cada uno de los MAbs purificados se observaron las bandas pertenecientes a las cadenas pesadas (CP, 50 kDa) y livianas (CL, 25 kDa) de los anticuerpos. De esta manera, el grado de pureza alcanzado luego de la purificación de cada MAb fue considerado adecuado para continuar con las siguientes etapas de caracterización y evaluación.

En la Figura 24 se muestran los títulos de sólo 6 MAbs anti-hTSH post-purificación (9.H2, M10.B5, P1.G3, P5.E7, PD.H10 y PGE9). Estos clones mostraron títulos mayores a 1:51.200, indicando una elevada capacidad de reconocimiento de la molécula utilizada como antígeno e inmovilizada en fase sólida. Anticuerpos con títulos menores a 1:51.200 no fueron tenidos en cuenta para las posteriores etapas de desarrollo.

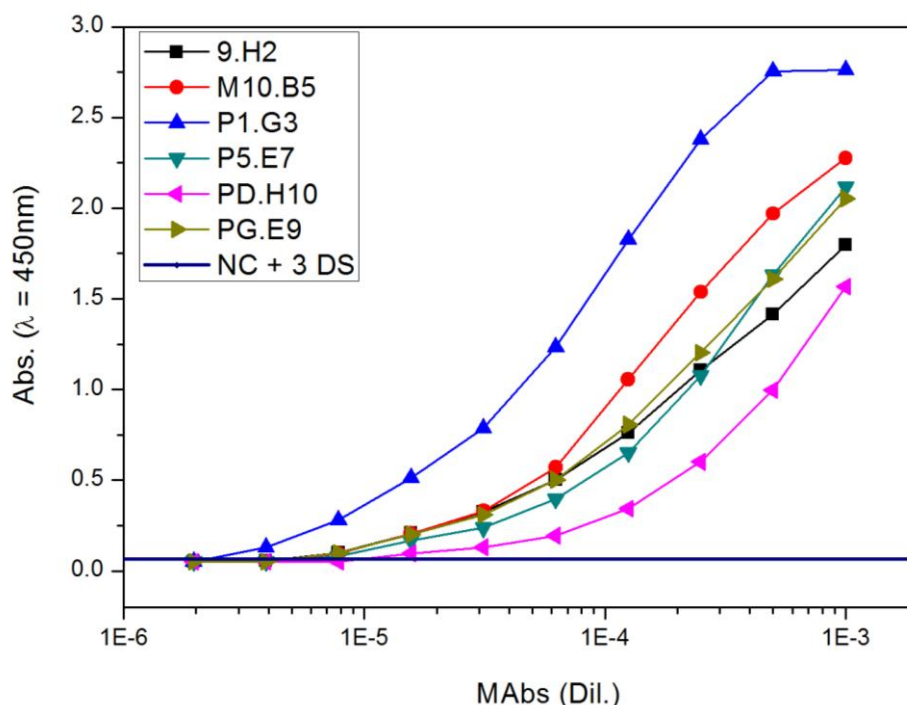


Figura 24: Evaluación del título de MABs purificados. Titulación de los extractos purificados de MABs anti-hTSH mediante ELISA específico indirecto. En línea continua se indica el valor promedio del control negativo + 3 desvíos estándar (DS).

4.5. Caracterización inmunoquímica y Estimación de K_{aff} aparente

La especificidad y afinidad de un anticuerpo determinan su calidad para la interacción y reconocimiento antigénico. Ambos parámetros dependen de la estructura del sitio de contacto del anticuerpo (paratope) con el antígeno. A nivel molecular, la topografía superficial y los arreglos de las interacciones no covalentes que se establecen entre antígeno y anticuerpo definen la especificidad, mientras que el tipo y la contribución energética de tales interacciones son los factores que establecen su afinidad.

La estimación de la constante de afinidad (K_{aff}) de los MABs anti-TSH seleccionados se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 3.12, mediante ELISA específico indirecto no-competitivo.

En las Figuras 25, 26 y 27 se muestran las curvas sigmoidea de UA versus Log [Ab] para cada una de las concentraciones de antígeno evaluadas (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$). La K_{aff} aparente se estimó como el promedio de las constantes obtenidas para cada curva.

La Tabla 4 contiene las K_{aff} aparente estimadas de un grupo MABs pertenecientes a diferentes grupos: MABs α -específicos (MABs α); MABs β -específicos (MABs β) y MABs $\beta_{(u)}$ -específicos (MABs $\beta_{(u)}$). En general, todas las estimaciones de K_{aff} estuvieron

en un rango comprendido entre 3×10^8 y $3,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Tabla 4: K_{aff} aparente estimada para algunos de los MAbs anti-hTSH seleccionados, a partir de las curvas sigmoidea de UA versus Log [Ab].

MAbs	9.H2	P1.G3	PD.H10	M10.B5	P5.E7	PG.E9
$K_{\text{aff}} + \text{DS}$	$3,2 \pm 0,7 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1,3 \pm 0,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$4,4 \pm 0,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1,4 \pm 0,1 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$1,8 \pm 0,9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$5,1 \pm 0,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$

También se determinaron las variedades isotópicas de las inmunoglobulinas monoclonales incorporándose, además, el análisis de cadena liviana. Todos los clones evaluados demostraron el mismo isotipo (IgG), subtipo IgG₁ o IgG_{2a}. Además, todos los clones pertenecen al grupo de isotipo de cadena liviana K.

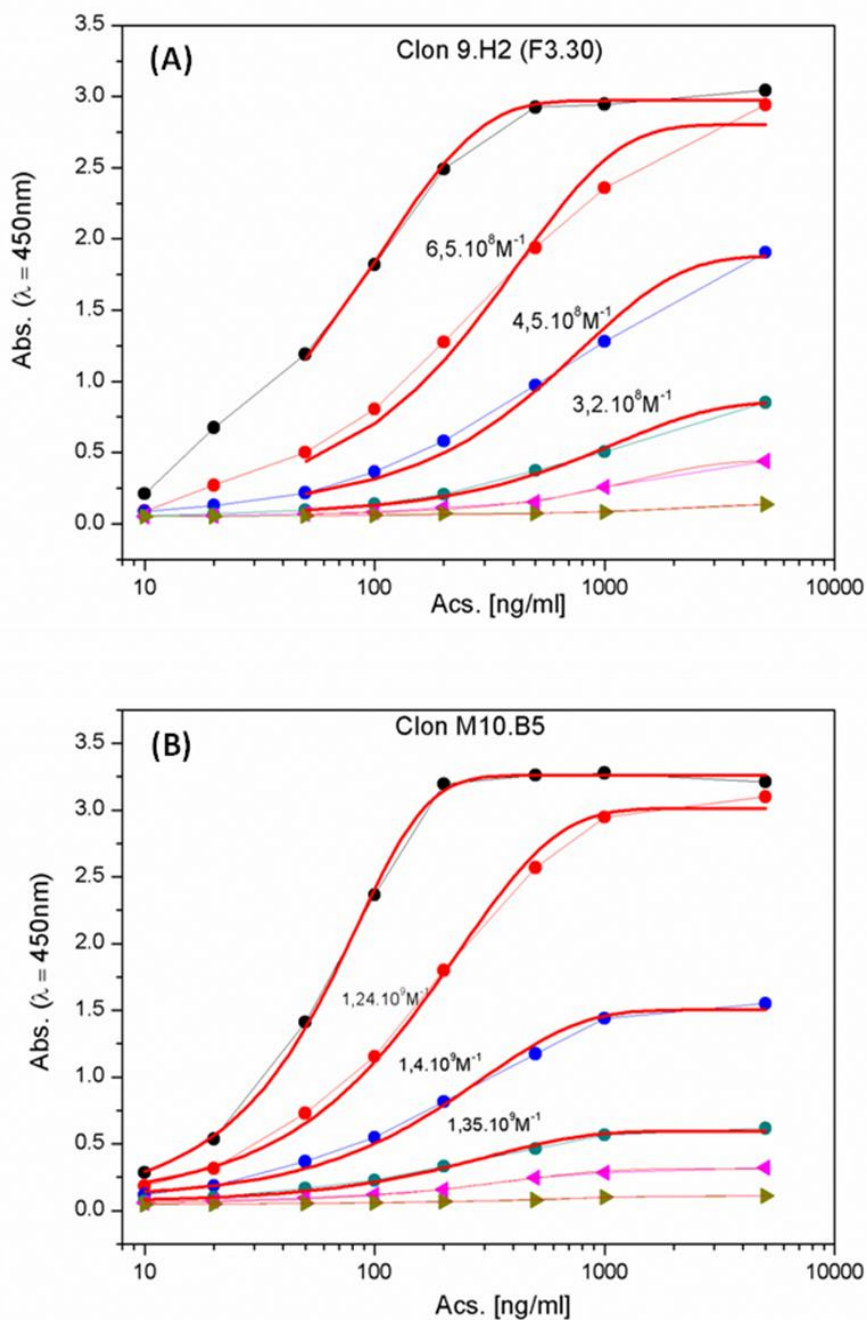


Figura 25: Estimación de la K_{aff} aparente de los clones 9.H2 (A) y M10.B5 (B). Se graficó UA versus Log [Ab] para cada una de las concentraciones de antígeno evaluadas (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 y 0,03 $\mu g/ml$), a partir de las cuales se estimó la K_{aff} utilizando la ecuación descrita en la sección 3.12.

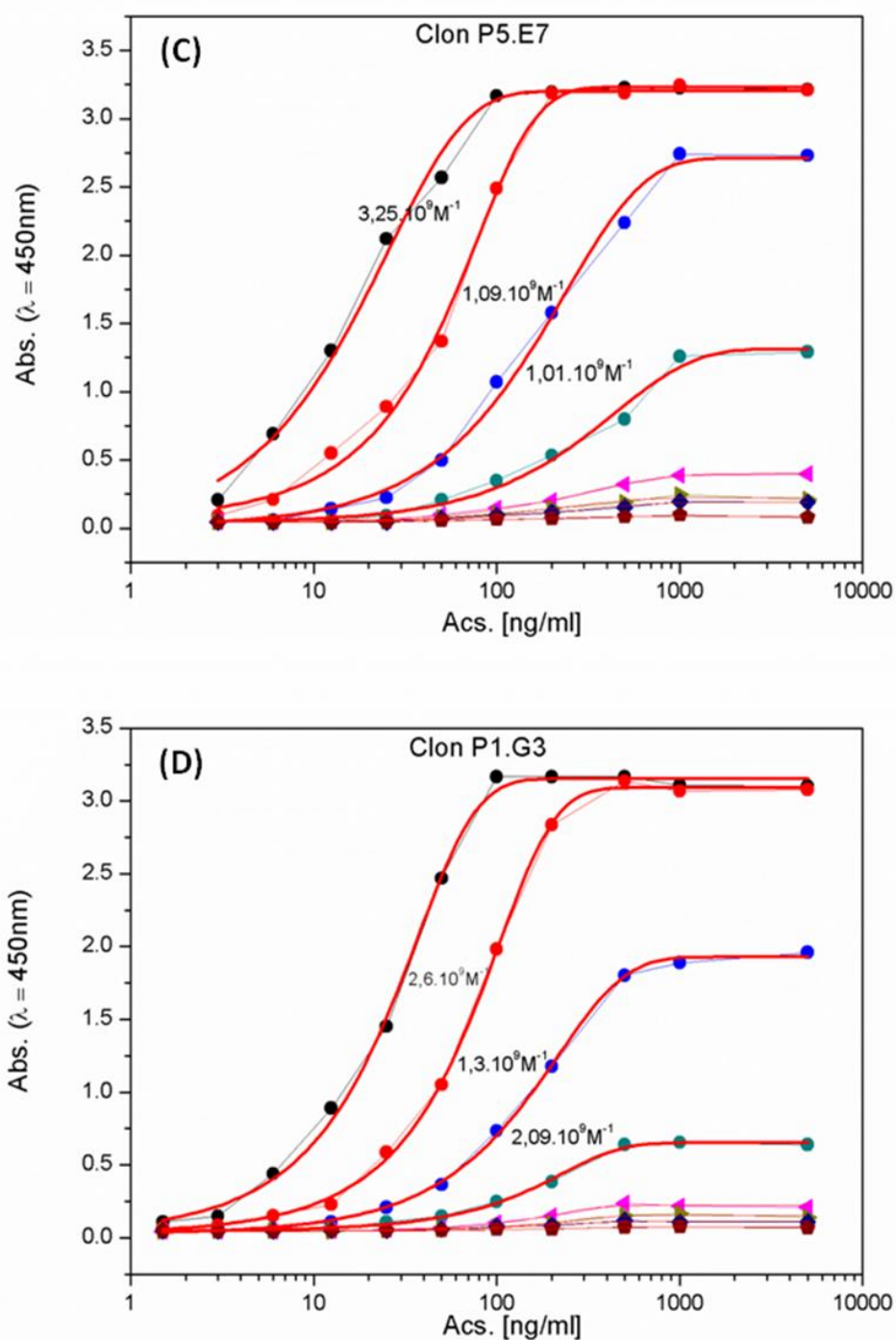


Figura 26: Estimación de la K_{aff} aparente de los clones P5.E7 (C) y P1.G3 (D). Se graficó UA versus Log [Ab] para cada una de las concentraciones de antígeno evaluadas (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$), a partir de las cuales se estimó la K_{aff} utilizando la ecuación descrita en la sección 3.12.

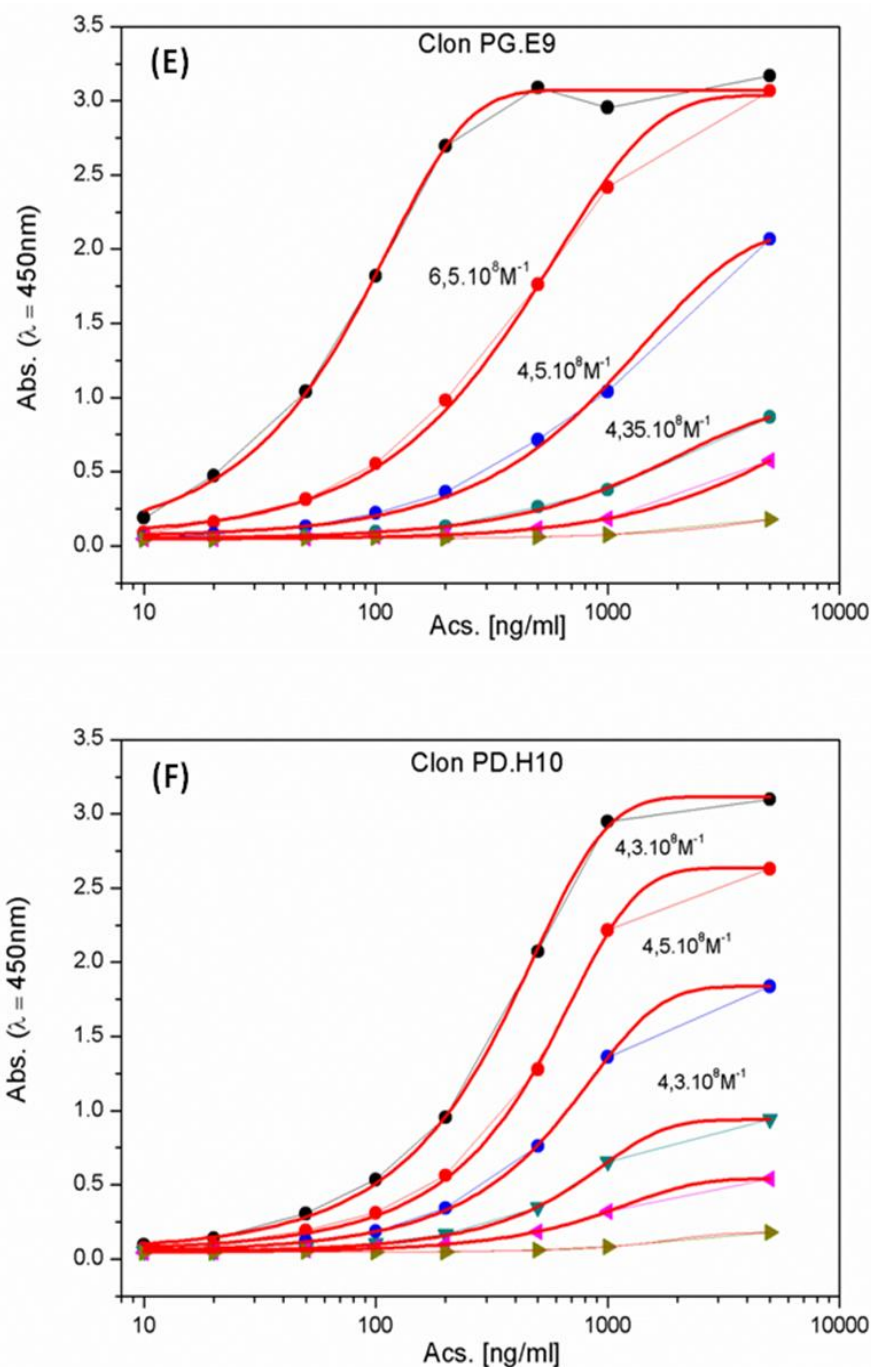


Figura 27: Estimación de la K_{aff} aparente de los clones: (E) PGE9 y (F) PD.H10. Se graficó UA versus Log [Ab] para cada una de las concentraciones de antígeno evaluadas (1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 y 0,03 $\mu\text{g/ml}$) a partir de las cuales se estimó la K_{aff} utilizando la ecuación descrita en la sección 3.12.

4.6. Evaluación de MAbs biotinilados

En total, de las etapas anteriores se seleccionaron diez clones: 9.H2, M10.B5, P1.G3, P5.E7, PD.H10, PGE9, PH.D4, 3.F7, HA_H2 y HA_E1. Los MAbs seleccionados fueron conjugados a biotina (EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-Biotin, Thermo) y en cada caso se evaluó el título de MAbs biotinilados mediante ensayos de ELISA específico

indirecto (Figura 28). Esta metodología permitió analizar, simultáneamente, la conjugación de la biotina con la estructura proteica del anticuerpo y el grado de influencia que esta modificación química tiene en su capacidad de reconocimiento antigénico.

En la Figura 28 se muestra el título de algunos de los MAbs conjugados a biotina. En todos los casos, el título se encontró en el rango comprendido entre 1:64.000 y 1:512.000. En comparación con los títulos determinados para los extractos purificados, no hubo una reducción en el título con respecto al mismo anticuerpo sin conjugar a biotina, conservando proporcionalmente una elevada capacidad de reconocimiento del antígeno en todos los casos.

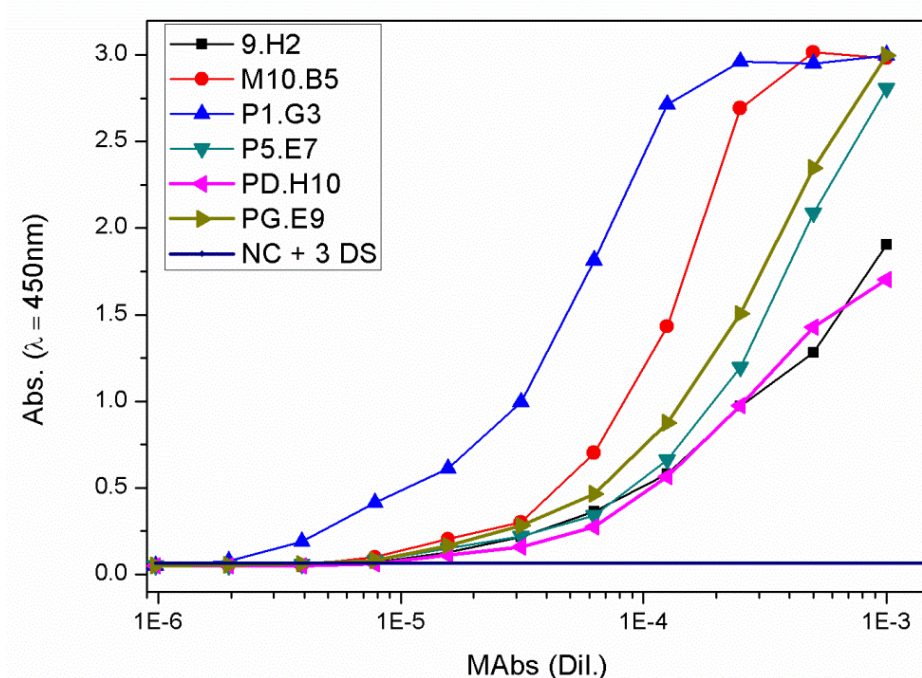


Figura 28: Evaluación de MAbs acoplados a biotina. Titulación de los MAbs anti-hTSH conjugados a biotina mediante técnica de ELISA específico indirecto. En línea continua se indica el valor promedio del control negativo + 3 DS.

4.7. Desarrollo de ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH

A partir de MAbs seleccionados en las etapas anteriores, se realizaron ensayos de ELISA *sandwich* indirecto, evaluando a cada uno de los MAbs tanto como anticuerpo de captura, así como anticuerpo de detección (Tabla 5). A diferencia de la primera etapa de clasificación del panel de MAbs, donde el antígeno se encuentra desnaturalizado y adsorbido a la placa (ELISA específico indirecto), en la configuración tipo *sandwich* el antígeno se encuentra en solución y es reconocido en su conformación nativa. Esta clase

de ensayos nos permitió identificar aquellos pares de anticuerpos capaces de reconocer la molécula en estas condiciones, los cuales serían los más aptos para todas aquellas inmunotécnicas que requieren el reconocimiento de la proteína en estado nativo.

Además, para diseñar un ensayo de ELISA *sandwich*, es necesario contar con anticuerpos capaces de reconocer diferentes regiones de hTSH, ya que se requieren dos anticuerpos específicos: uno de captura y otro de detección. Como se mencionó anteriormente, fracciones de MAbs pertenecientes a los diferentes grupos (α , β y $\beta(\alpha)$), todos subclase IgG₁ y con constantes de afinidad aparente que varían entre que varían entre $5,1 \times 10^8$ y $3,6 \times 10^9$ M⁻¹, fueron conjugados a biotina. El efecto de la biotinilación sobre la inmunoreactividad de los mismos se evaluó por ELISA indirecto.

Del total del panel obtenido como resultado de las fusiones celulares se seleccionaron diez MAbs y se evaluaron tanto como captura, como anticuerpo de detección (marcado con biotina) en un ELISA de sándwich hTSH (Tabla 5).

Tabla 5: Evaluación de MAbs para ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH. Se definieron cuatro patrones de captura de antígeno: + + + completo (100% - 80% de captura de antígeno); + + Parcial (79% - 20% de captura de antígeno); + Mínimo (menos del 20% de captura del antígeno); Y - negativo (sin captura de antígeno).

Mab en fase sólida		Mab en fase líquida (acoplado a biotina)									
		α	β	β	α	β	$\beta(\alpha)$	$\beta(\alpha)$	$\beta(\alpha)$	α	$\beta(\alpha)$
		PD.H10	P5.E7	PG.E9	P1.G3	PH.D4	M10.B5	9.H8	3.F7	HA_H2	HA_E1
α	PD.H10	●	-	+	+	+	+	+	+	-	+
β	P5.E7	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
β	PG.E9	+++	-	●	+	-	+++	+	+	-	+
α	P1.G3	+	-	+++	●	++	+++	+	+	-	+
β	PH.D4	+++	-	-	+	●	+	+	+	-	+
$\beta(\alpha)$	M10.B5	+++	-	+++	++	+++	●	+	+	-	+
$\beta(\alpha)$	9.H2	+	-	+	+	+	+	●	+	-	+
$\beta(\alpha)$	3.F7	+	-	+	+	+	+	+	●	-	+
α	HA_H2	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-
$\beta(\alpha)$	HA_E1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	●

Los datos de la tabla 5 muestran que, de las noventa combinaciones de MAbs estudiadas, sólo ocho mostraron al menos el 80% de la captura de hTSH (recuadros grises). El resto de las combinaciones de MAbs evidenciaron captura intermedia o mínima de hTSH. Por otro lado, observamos que P5.E7 o HA_H2 fueron negativos en

todos los casos. Probablemente esto se deba a que, tanto el MAb P5.E7 como HA_H2, reconocen su correspondiente epítopo en la molécula de hTSH cuando esta se encuentra en forma desnaturalizada o con una conformación no nativa (ELISA indirecto) pero no lo hacen cuando el antígeno se encuentra en una conformación nativa (ELISA *sandwich*).

Para facilitar la identificación de los pares de MAbs que mostraron patrones de captura de antígenos de al menos el 80%, se renombraron de la siguiente manera: A-1 (PGE9 PD.H10), B-1 (PH.D4-PD.H10), C-1 (M10.B5 – PD.H10), B-4 (M10.B5 - PH.D4), B-9 (M10.B5 - PGE9), C-5 (PGE9 - M10.B5), D-5 (P1.G3 - M10.B5) y D-9 (P1.G3 - PGE9). De esta manera serán referidos a continuación durante el resto de este trabajo de tesis.

4.8. Especificidad de los pares de MAbs

Una vez seleccionados los distintos pares de anticuerpos con capacidad de captura y detección del antígeno en estado nativo, se realizó la evaluación de la especificidad de cada par de MAbs propuesto. Se investigó la potencial reacción cruzada con hTSH, r-hFSH, hCG y hLH, realizando un ELISA *sandwich* con cada una de las ocho combinaciones de MAbs (A-1, B-1, C-1, B-4, B-9, C-5, D-5 y D-9). Para esto se realizaron ensayos frente a las glicohormonas diluidas en búfer PBS-BSA-T. El ensayo también se realizó con un sistema comercial para detección de TSH humana, de amplio uso en clínica humana y con especificidad validada (U-TSH Kit, EIAgen - Adaltis).

En las Figuras 29, 30 y 31 se muestran los resultados, en comparación con el kit comercial. Todos los pares de MAbs fueron altamente específicos para detectar hTSH y no mostraron reacción cruzada significativa con el resto de las hormonas glicoproteicas, excepto el D-5 que evidenció una fuerte reacción cruzada con r-hFSH. En base a esto, se descartó el D-5, mientras que aquellos pares con buen nivel de detección de hTSH y baja o nula reacción con r-hFSH (A-1, B-1; C-1; B-4, B-9, C-5 y D-9) fueron usados en las siguientes etapas del trabajo de tesis.

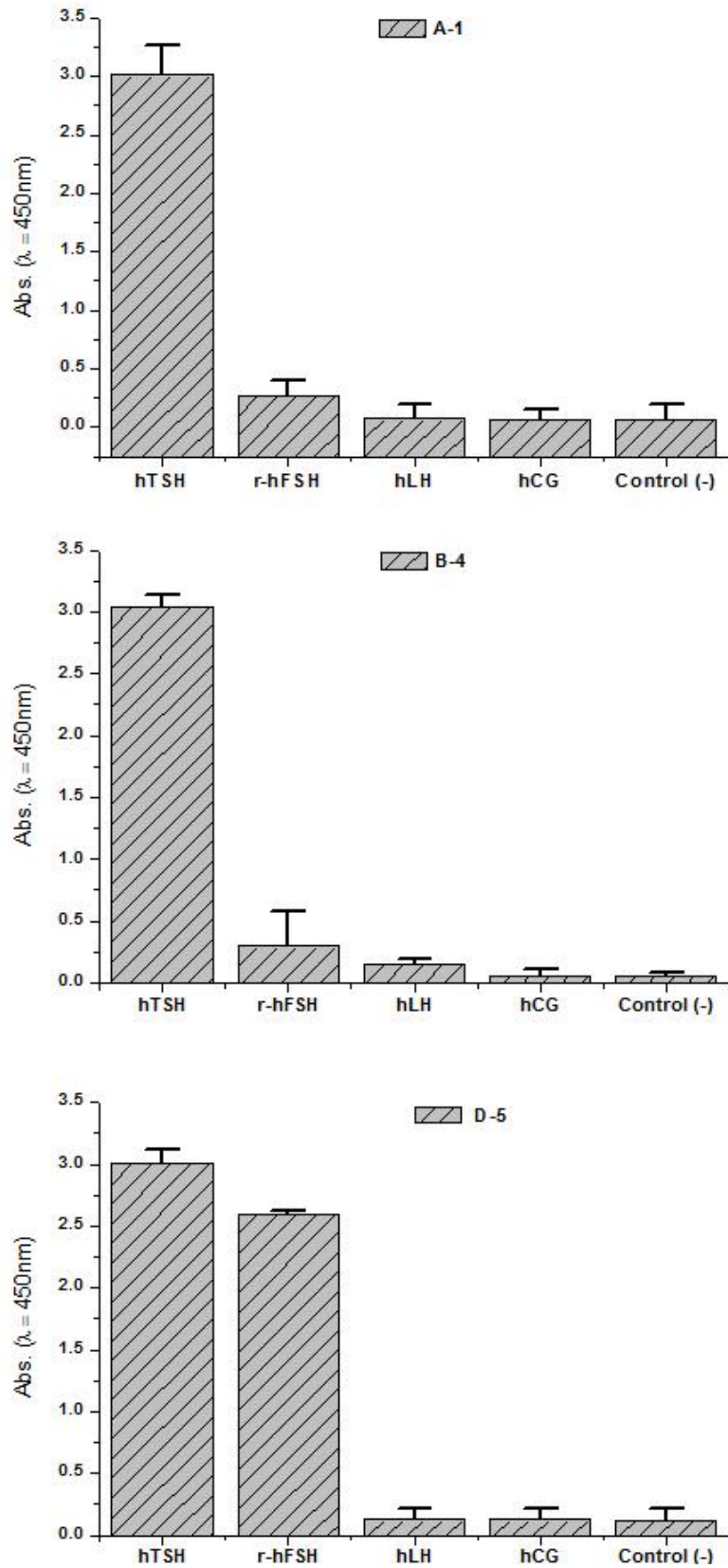


Figura 29: Evaluación de la especificidad de los pares A-1, B-4 y D-5. ELISA sandwich frente a hTSH, r-hFSH, hLH y hCG. Todos los antígenos se evaluaron en una concentración de 100 ng/pozo. En el eje de ordenadas se graficó la absorbancia medida a una $\lambda = 450\text{nm}$ para cada una de los antígenos evaluados (eje de las abscisas).

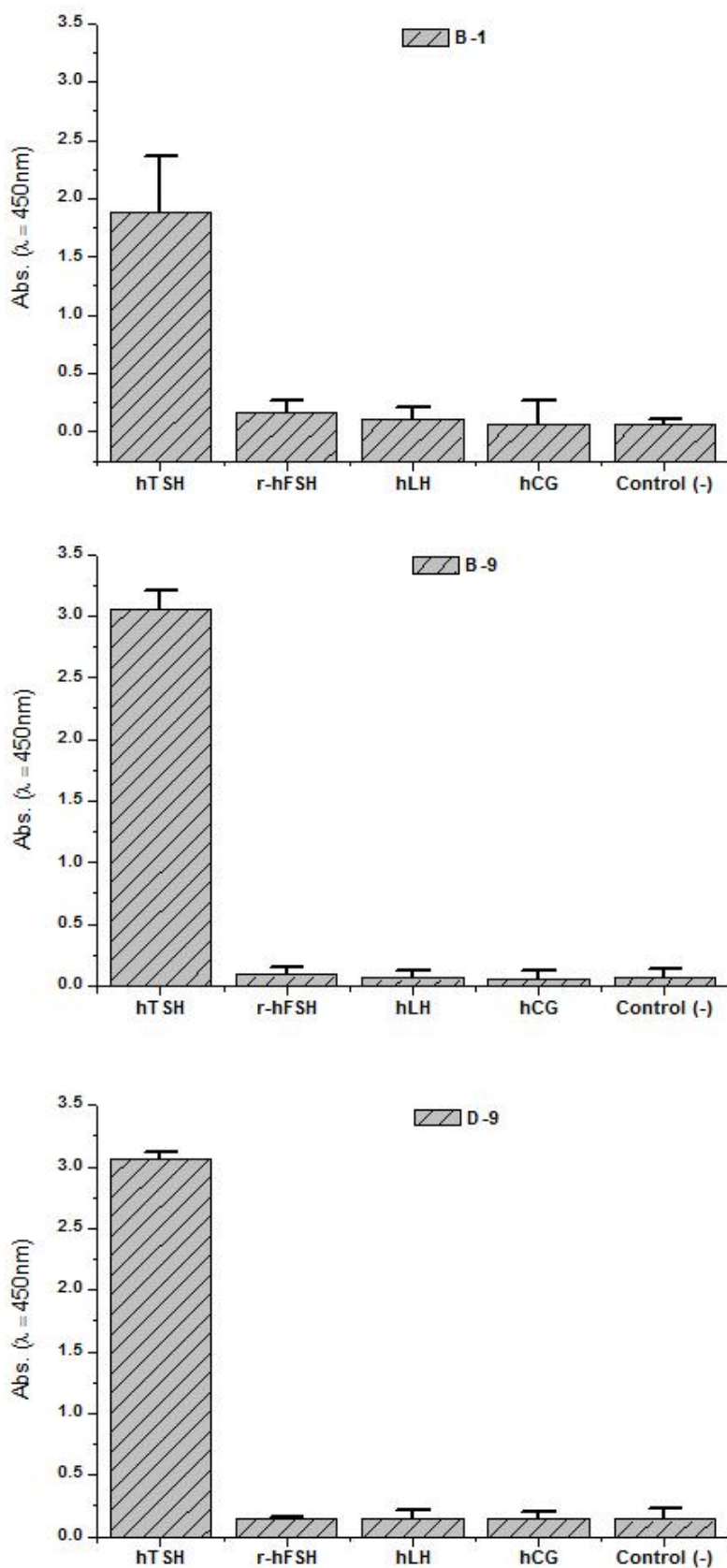


Figura 30: Evaluación de la especificidad de los pares B-1, B-9 y D-9. ELISA sandwich frente a hTSH, r-hFSH, hLH y hCG. Los antígenos se evaluaron en una concentración de 100 ng/pozo. En el eje de ordenadas se graficó la absorbancia medida a una $\lambda = 450\text{nm}$ para cada una de los antígenos evaluados (eje de las abscisas).

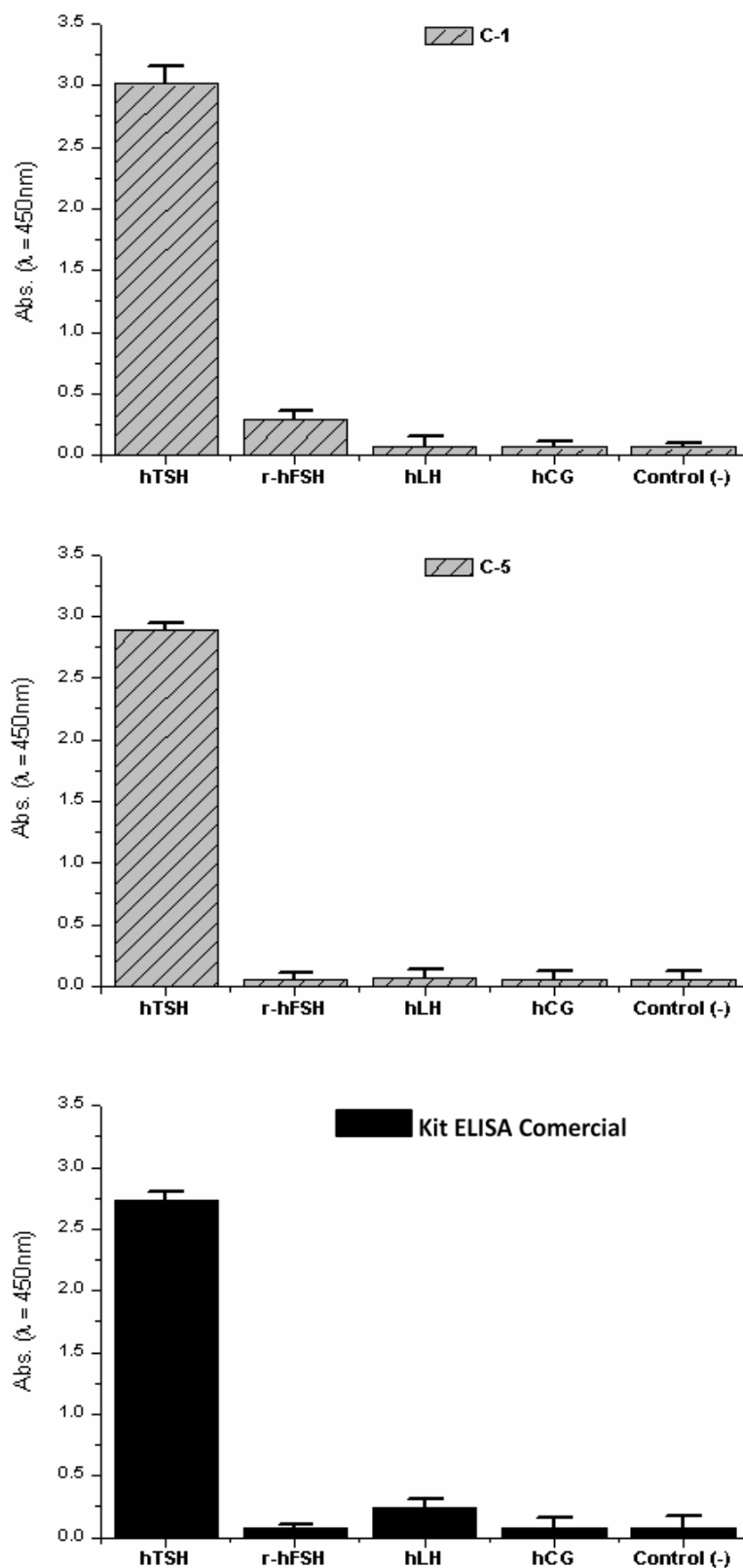


Figura 31: Evaluación de la especificidad de los pares C-1, C-5 y kit comercial. ELISA sandwich frente a hTSH, r-hFSH, hLH y hCG. Los antígenos se evaluaron en una concentración de 100 ng/pozo. En el eje de ordenadas se graficó la absorbancia medida a una $\lambda = 450\text{nm}$ para cada una de los antígenos evaluados (eje de las abscisas).

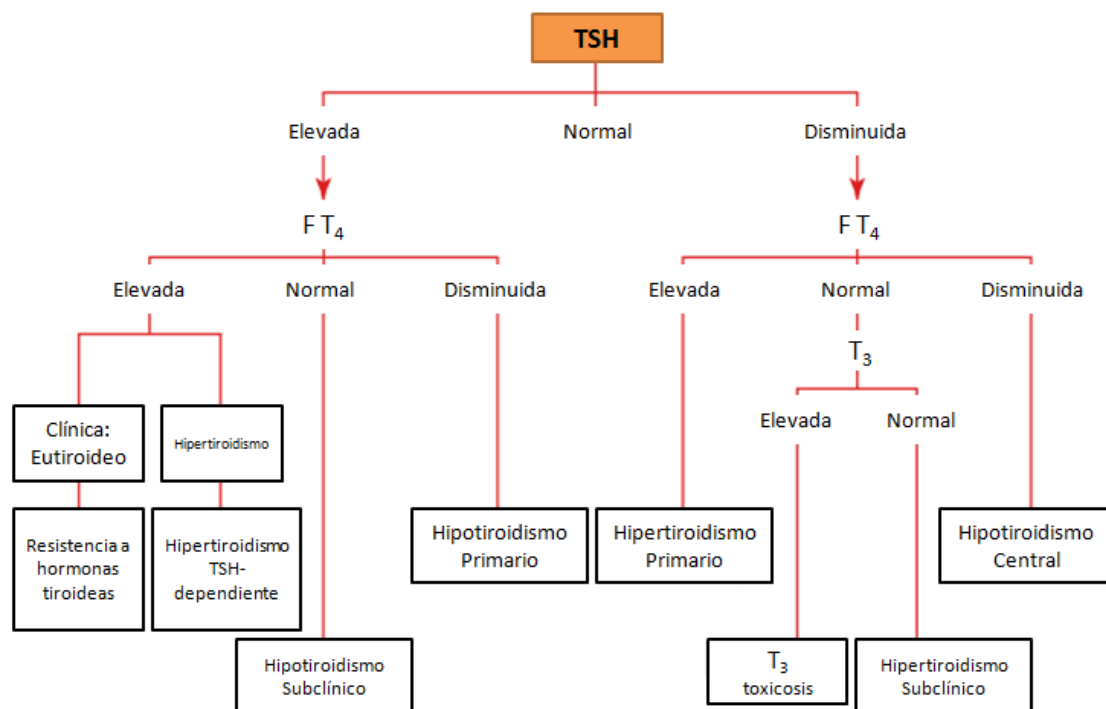
CAPÍTULO IV:
DESARROLLO DE UN ELISA
***SANDWICH* PARA LA**
DETERMINACIÓN DE TSH
EN SUERO HUMANO

1. Introducción

1.1. Variaciones fisiológicas de TSH en suero humano

Hace muchos años se ha reconocido que, después de la diabetes mellitus, los trastornos endocrinos más frecuentes nivel mundial son los de la glándula tiroides [97]. A partir de información obtenida de la historia clínica, los estudios físicos y los análisis bioquímicos de laboratorio, los pacientes son clasificados como hipotiroideos, hipotiroideos o eutiroideos (Tabla 6). La determinación de TSH en suero se utiliza tanto como una herramienta de diagnóstico del funcionamiento tiroideo como para el monitoreo del tratamiento terapéutico de la enfermedad [98].

Tabla 6: Esquema sugerido para la evaluación de las funciones tiroideas (Tabla modificada de Winter y col., 2015a).



La secreción de TSH posee variaciones pulsátil y circadiana [99], con concentraciones máximas durante la madrugada (2:00 – 4:00 AM) y mínimas durante la tarde (5:00 y 6:00 PM), con oscilaciones de baja amplitud a lo largo del día. La vida media de TSH en plasma es de aproximadamente 30 minutos. La TSH “aparece” inmediatamente después del nacimiento, alcanzando picos de 25 a 160 $\mu\text{UI/ml}$ en 30 minutos y luego disminuyendo a concentraciones sanguíneas del cordón umbilical en el tercer día posnatal [100]. En las siguientes semanas las concentraciones de TSH se estabilizan hasta llegar a las concentraciones cercanas a la de los adultos. En mujeres embarazadas,

durante el primer trimestre, las concentraciones de TSH disminuyen a medida que la hCG estimula la glándula materno-tiroidea para producir hormonas tiroideas, lo que a veces conduce a un nivel de TSH que está justo por debajo del límite inferior o el intervalo de referencia. Los intervalos de referencia y las concentraciones de TSH en personas adultas son similares entre hombres y mujeres (Tabla 7) [101] .

Tabla 7: Intervalos de referencia de TSH en suero humano (Tabla modificada de Winter y col., 2015b). Valores normales de TSH en diferentes condiciones y/o franjas etarias.

Tirotropina (Hormona estimulante de tiroides o TSH)		
Condición		μUI/ml
Nac. Prematuros	<i>28 - 36 semanas</i>	0,7 - 27
Sangre de cordón umb.	<i>> 37 semanas</i>	2,3 - 13,2
Niños - Jóvenes	<i>Nac. - 4 días</i>	1 - 39,0
	<i>2 - 20 semanas</i>	1,7 - 9,1
	<i>21 semanas - 20 años</i>	0,7 - 6,4
Adultos/Ancianos	<i>21 - 87 años</i>	0,4 - 4,5
Preñez	<i>Primer trimestre</i>	0,3 - 4,5
	<i>Segundo trimestre</i>	0,5 - 4,6
	<i>Tercer trimestre</i>	0,8 - 5,2
Recién nacido	-	< 20

Por otro lado, la magnitud de las pulsaciones de TSH disminuye en situaciones de ayuno, en episodios de enfermedad o luego de cirugías. El rango normal de TSH en suero de personas adultas está comprendido entre 0,3 y 5 μUI/ml (0,05 – 0,8 ng/ml), sin embargo la mayoría de las personas en estado eutiroideo presentan niveles hormonales por debajo de 2 μUI/ml [102]. Una fracción importante de la población se encuentra afectada por un algún tipo de afección tiroidea, pero comúnmente estas patologías son subdiagnosticadas debido a sistemas de monitoreo clínico ineficaces [103].

Dado que tanto T₄ como T₃ median la regulación de retroalimentación de la secreción de TSH y existe una relación inversa lineal entre la concentración de T₄ libre en suero y el logaritmo de la concentración de TSH (Figura 32), la determinación cuantitativa de TSH es un indicador exquisitamente sensible del estado tiroideo de pacientes con un eje hipotalámico-hipofisario intacto [104]. Es imprescindible disponer de métodos prácticos

y precisos para la detección de TSH, ya que existen numerosas alteraciones del funcionamiento tiroideo, en neonatos, adultos mayores o incluso durante diferentes etapas del embarazo. Ciertas alteraciones en las funciones tiroideas pueden ser muy graves, ya que son causas de insuficiencia cardíaca para la madre, aborto espontáneo o deterioro del desarrollo cognitivo en niños, entre otras patologías.

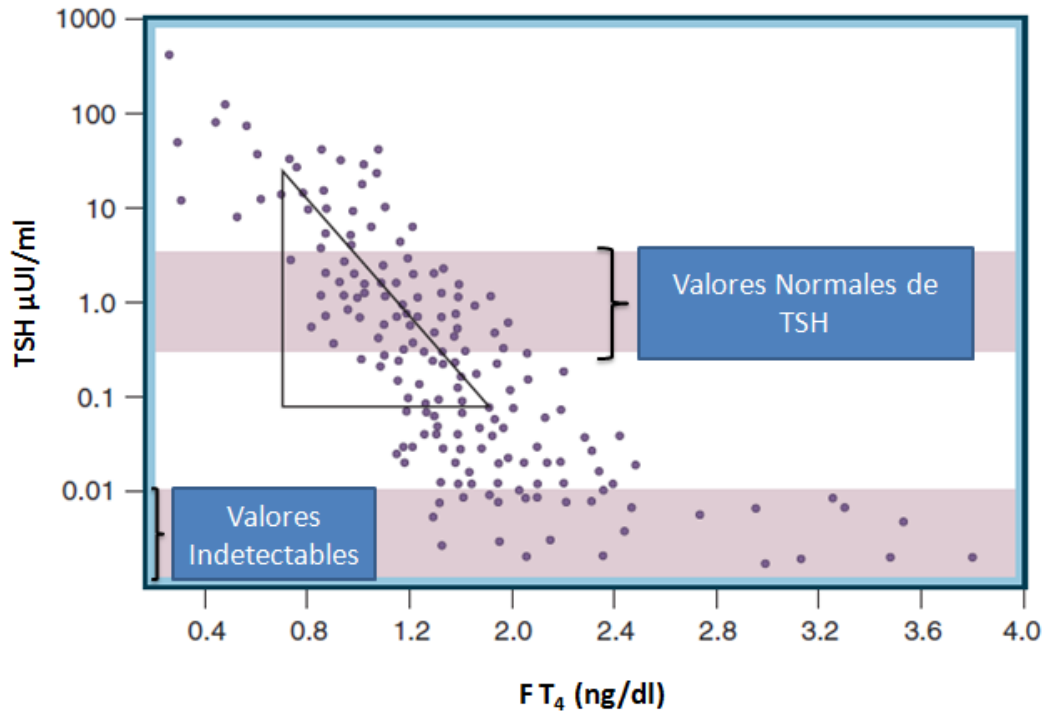


Figura 32: Relación entre las concentraciones séricas de TSH y T_4 libre (FT_4) (Figura modificada de Shlomo Melmed y col., 2011c). Se muestran concentraciones típicas de FT_4 en pacientes hipotiroideos, eutiroideos e hipertiroides, mediante la relación logarítmica/ lineal entre TSH y la concentración de T_4 libre (FT_4) en suero.

1.2. Cuantificación de TSH en suero humano

Por su facilidad de uso, practicidad, posibilidad de sistematización y menor costo, los inmunoensayos han sido los métodos más empleados para el análisis cuantitativo de TSH en suero humano. Si bien durante los últimos 30 años se ha trabajado intensamente en el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos eficaces aún hoy es difícil disponer de métodos confiables en cuanto a sensibilidad, precisión y exactitud. Estos parámetros funcionales son a menudo difíciles de lograr en forma simultánea, por lo que cambios muy pequeños de los niveles de hormona en suero pueden ser eventualmente no detectados. Por esta razón, se hizo imprescindible desarrollar ensayos “ultrasensibles”

que permitan determinar cuantitativamente bajas concentraciones del analito y que también sean capaces de detectar pequeños cambios en las concentraciones.

Los primeros ensayos "ultrasensibles" para la determinación de la TSH sérica datan a partir de 1965 y fueron los denominados radioinmunoensayos (RIAs) [105]. Estos métodos permitieron desarrollar ensayos radiométricos con incrementos notables de sensibilidad y especificidad [106]. La desventaja de estos métodos residía en el uso de materiales radioyodados y protocolos con largos períodos de incubación. Actualmente, los RIAs siguen siendo muy empleados en una variedad de aplicaciones de diagnóstico, aunque los principales inconvenientes incluyen la rápida desintegración de isótopos con vida media corta, los peligros inherentes a los compuestos radioactivos y el costo asociado a la manipulación y eliminación de este tipo de materiales.

Los ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays*), comenzaron su desarrollo a principios de los años 70 [107,108] y ofrecieron una importante alternativa al uso de radioisótopos. Se emplearon marcadores enzimáticos, tales como la peroxidasa de rábano picante o la fosfatasa alcalina para la generación de señales, cuantificándose la absorbancia mediante espectrofotometría. La generación de señal se logró mediante la actividad de una enzima que actúa sobre un sustrato químico, produciendo un producto coloreado o fluorescente en relación con la cantidad de reactivos unidos [109].

Luego de los años 80, y con el desarrollo de la tecnología para la producción de anticuerpos monoclonales, se desarrollaron los ensayos inmunométricos (IMAs, por sus siglas en inglés). Esencialmente, hoy en día, todos los métodos para la detección de TSH en suero utilizados en los laboratorios clínicos son inmunoensayos heterogéneos a dos centros o *sandwich* que involucran: (1) una enzima, (2) sustratos cromogénicos o (3) marcadores quimioluminiscentes. En estos inmunoensayos se utilizan anticuerpos monoclonales dirigidos contra dos sitios diferentes de la hormona. En líneas generales, un anticuerpo se dirige hacia la subunidad específica de la molécula de TSH, y un segundo anticuerpo (que está marcado con una molécula radiactiva, una enzima, un fluoróforo, o moléculas quimioluminiscentes) se fija a continuación a la TSH para formar una molécula "*sandwich*" que puede detectarse y cuantificarse fácilmente. En comparación con otros inmunoensayos competitivos tradicionales, como RIA, los inmunoensayos heterogéneos de TSH ofrecen límites de detección inferiores, tiempo de respuesta rápida y un rango de medición lineal más amplio [98]. En la actualidad y con la incorporación de nuevas tecnologías se pueden encontrar reportes con niveles de detección de la hormona en el rango de 0,001 $\mu\text{UI/ml}$ [102].

Históricamente, la nomenclatura utilizada para describir estos ensayos ha sido confusa. A medida que los RIA se fueron dejando de lado y avanzaron las mejoras en los IMAs, se aplicaron muchos términos descriptivos a estas nuevas pruebas, incluyendo "sensible", "supersensible" y "ultrasensible". Sin embargo, estos términos no proporcionaron información adecuada sobre las verdaderas características de rendimiento de estas pruebas o su eficacia clínica [110]. En 1987, la Asociación Americana de Tiroides (ATA, por sus siglas en inglés), en un intento de superar los problemas de nomenclatura, publicó pautas en las que se establecía que el término ensayo *sensible* para la detección de TSH se aplicaría únicamente a aquellos métodos capaces de diferenciar funcionalmente los niveles de TSH característicos del hipertiroidismo, definido como los niveles mayores a 3 DS por debajo de la media de los valores observados en pacientes sanos o eutiroideos. Los problemas de consistencia en la medición de niveles muy bajos de TSH por algunos sistemas condujeron al desarrollo de otras pautas en 1991, en las que se redefinieron los criterios de sensibilidad funcional y se agregaron estándares analíticos específicos para la definición de ensayos de TSH sensibles.

Otro esquema de clasificación es de naturaleza *generacional* y se basa en la performance funcional del ensayo. Cada generación refleja esencialmente una mejora de diez veces en el LD del ensayo. Los tests de *primera generación*, desarrollados inicialmente, poseen LD de 1 a 2 $\mu\text{UI/ml}$. Los ensayos de *segunda generación* proporcionan un LD inferior, comprendido entre 0,1 a 0,2 $\mu\text{UI/ml}$, y los de *tercera generación* 0,01 a 0,02 $\mu\text{UI/ml}$, y así sucesivamente. Este sistema de clasificación eliminó la dificultad en la terminología asociada a los ensayos sensibles para la detección de TSH y también permitió la clasificación de pruebas con características de rendimiento mejoradas.

2. Objetivos

- 1) *Estudiar diferentes matrices para la producción de una curva estándar de hTSH en rango de concentraciones fisiológicas.*
- 2) *Evaluar la performance de los pares de MAbs seleccionados para la detección específica frente a concentraciones bajas de hTSH.*
- 3) *Evaluar los pares de MAbs para la detección de hTSH en pools de suero humano.*
- 4) *Optimizar las condiciones de ensayo de los prototipos de ELISA sandwich para la detección específica de hTSH en suero humano.*
- 5) *Evaluar los prototipos de ELISA sandwich con estándares comerciales preparados en función de la 2^ª Preparación de Referencia Internacional de hTSH (IRP 80/558) de la OMS y en comparación con un kit comercial.*
- 6) *Determinar los parámetros funcionales de los prototipos de ELISA sandwich para la detección de TSH en muestras de suero humano.*

3. Materiales y Métodos

En el capítulo anterior se describió la obtención de un panel de MAbs anti-hTSH clasificados según el reconocimiento a diferentes epitopes (MAbs α , MAbs β y MAbs $\beta_{(\alpha)}$). Luego de la evaluación de distintas combinaciones entre anticuerpos (MAb de captura – MAb de detección conjugado a biotina) en ensayos de ELISA *sandwich*, se identificaron aquellos pares con capacidad de capturar la hormona en estado nativo. Posteriormente, las combinaciones de MAbs fueron evaluadas según su especificidad frente a las glicoproteínas estructuralmente relacionadas (hTSH, r-hFSH, hCG y hLH) en búfer PBS-BSA-T. Finalmente, los pares de MAbs, denominados como: A-1, B-1; C-1; B-4, B-9, C-5 y D-9 (prototipos), fueron seleccionados para continuar con el trabajo de tesis.

3.1. Estudio de matrices para la producción de estándares de calibrado.

Dado que durante el desarrollo y evaluación de los distintos pares de MAbs para la detección específica de TSH se utilizan calibradores comerciales, decidimos sustituir éstos al menos en ensayos preliminares, elaborando nuestra propia curva de calibrado estándar. Utilizando el kit comercial U-TSH EIAgen Kit (Adaltis), se evaluaron diluciones sucesivas de hTSH (100 ng/ml - 0,001 ng/ml) en matrices de PBS-Leche-Tween 20 0,05% (PBS-L-T) y PBS-BSA-Tween 0,05% (PBS-BSA-T). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

3.2. Detección de hTSH en bajas concentraciones

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de cada MAb anti-hTSH seleccionado (10 μ g/ml en solución de sensibilización). Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 μ l/pozo de solución de Solución de Bloqueo. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Antígeno: se agregaron 100 μ l/pozo de hTSH (0,1 ng/ml – 10 ng/ml) diluida en una concentración en PBS-L-T o PBS-BSA-T. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 μ l/pozo de cada MAb anti-hTSH biotinilado (10 μ g/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.

- 5) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 6) Revelado: comprende la reacción enzimática que emplea como sustrato cromogénico TMB (Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensan 100 µl/pozo del reactivo cromogénico. Se incubó en oscuridad y a TA. La reacción colorimétrica se detiene agregando 100 µl/pozo de H₂SO₄ 12% (Solución *Stop*). La lectura del color generado se efectuó a $\lambda = 450$ nm, en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).
- 7) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
(-) sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado (PBS-T). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

En paralelo se realizó la misma evaluación utilizando un kit comercial (U-TSH EIAgen Kit, Adaltis). El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit.

3.3. Evaluación de los prototipos de ELISA *sandwich* en *pooles* de suero humano

Esta etapa tuvo como objetivo identificar cualitativamente aquellas combinaciones de anticuerpos capaces de detectar TSH nativa en suero humano. Los ensayos de detección de la hormona se realizaron en *pooles* de sueros previamente valorados con un kit inmunométrico comercial (U-TSH EIAgen Kit, Adaltis), en concentraciones de hTSH comprendidas entre 0,45 – 6,50 µUI/ml.

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de cada MAb anti-hTSH seleccionado (10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de Solución de Bloqueo. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Muestras: se agregaron 100 µl/pozo de muestras de suero humano prevalorados. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.

- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 µl/pozo de cada MAb anti-hTSH biotinilado (10 µg/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 6) Revelado: ídem punto 3.2., inciso 6).
- 7) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
(-) sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con PBS-T. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.4. Optimización de las condiciones de ensayos de los prototipos B-4 y B-9

Se estudiaron y optimizaron variables operativas como: volumen y tiempos de reacción, temperaturas de incubación, búferes y concentraciones de inmunoreactivos.

Se evaluaron diferentes agentes de bloqueo (PBS-BSA, PBS-L), así como sin etapa de bloqueo, concentraciones de anticuerpos y temperaturas de incubación (37°C y TA). Por otro lado, estudiamos los inmunoensayos en dos esquemas operativos de trabajo. En el esquema de una etapa (1 etapa), el MAb de detección (anticuerpo conjugado a biotina) y la muestra (suero o calibradores) son incubados juntos, en una única etapa (volumen de reacción/pocillo: 200 µl), en las placas sensibilizadas con el MAb de captura. En cambio en el ensayo de ELISA *sandwich* en dos etapas (2 etapas), el MAb de detección y la muestra son incubados en etapas separadas e independientes (volumen de reacción/pocillo: 100 µl).

Se estudiaron dos agentes de bloqueo. Las placas se sensibilizaron con los MAb de captura diluidos en búfer carbonato (pH = 9,6) y se incubaron ON a 4°C. Luego de lavados con PBS-T, los sitios de unión inespecíficas fueron bloqueados con PBS-BSA 1% (PBS-BSA) o PBS-Leche 1% (PBS-L) por 2 horas a 37 °C o TA. Luego de los lavados, se agregó el antígeno diluido en PBS-L-T (10 ng/ml, 100 µl/pocillo). Luego de la incubación por 2 horas a 37 °C o TA, las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron diluciones en PBS-BSA-T o PBS-L-T de cada MAb de detección (1 µg/ml). En los ensayos en una etapa, el MAb de detección y la muestra (hTSH) se incuban en simultáneo (volumen final: 200 µl/pocillo). Luego de 1 hora 30 minutos, se lavaron las

placas nuevamente con PBS-T y se agregó el conjugado enzimático (estreptavidina-peroxidasa; Sigma), diluido 1:2.000 en PBS-BSA-T e incubado por 30 minutos a 37 °C. La actividad enzimática se midió agregando el reactivo cromóforo TMB. La reacción se detuvo agregando Solución *Stop*. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. En el esquema de dos etapas, el protocolo empleado fue exactamente el mismo, excepto que el MAb de detección y la muestra se incubaron en etapas separadas e independientes.

Posteriormente, se determinaron las concentraciones óptimas tanto del anticuerpo de captura como del de detección. Los MAbs de captura fueron diluidos en búfer de sensibilización en un rango entre 0,5 y 50 µg/ml (100 µl/pocillo) y se incubaron ON a 4 °C. Luego del lavado, se procedió con el ensayo tal como se describió anteriormente (ver 3.2).

También, se estudiaron diferentes concentraciones para los MAbs de detección (0,1 – 10 µg/ml), diluidos en PBS-BSA-T o PBS-L-T. Los inmunoensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito antes (ver 3.2)

Finalmente, se estudió la concentración óptima del conjugado enzimático estreptavidina-peroxidasa, en diluciones comprendidas entre 1:500 y 1:5.000, en PBS-BSA-T o PBS-L-T, incubadas por 30 minutos a 37 °C.

3.5. Evaluación de los prototipos de ELISA *sandwich* con estándares comerciales

Se evaluó la capacidad de B-4 y B-9 para detectar la hormona en estándares comerciales preparados según la 2° Preparación de Referencia Internacional de hTSH (IRP 80/558) de la OMS. El protocolo final general de los ensayos de ELISA *sandwich* establecido para los prototipos B-4 y B-9 (sin mencionar las etapas de lavado y temperaturas de incubación) fue el siguiente:

- 1) Sensibilización con MAbs de captura en búfer carbonato pH = 9,6 (ON).
- 2) Muestra/Antígeno + MAbs de detección conjugado a biotina. V_f: 200µl, incubación 2 horas.
- 3) STV-HRP 1:1.000. V_f: 100µl – Incubación 30 minutos.
- 4) TMB - H₂SO₄ (12%). V_f: 200µl – T. reacción 30 minutos.
- 5) Lectura a $\lambda = 450 \text{ nm}$

3.6. Western blot

Con el objeto de evaluar la especificidad de los MAbs B-9 (M10.B5 y PG.E9) en suero humano, se utilizó el ensayo de *Western blot* en condiciones nativas. El ensayo consistió básicamente en tres pasos: separación electroforética de los componentes de las muestras en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas, electrotransferencia de los mismos a una membrana de nitrocelulosa y reconocimiento de las moléculas transferidas por interacción con anticuerpos específicos.

Se utilizaron las siguientes muestras y controles:

- (1) Muestras de suero humano
- (2) Control Positivo: TSH (28 kDa) diluida en PBS
- (3) Proteínas puras de peso molecular conocido utilizadas como patrones: MAbs IgG₂ (150 kDa); BSA (66 kDa) y GST (26kDa).

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (PAGE), en condiciones nativas. Para ello se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% P/V y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 10% P/V. Las muestras se mezclaron con una solución de Tris 50 mM, Glicerol 10% V/V, azul de bromofenol 0,05% P/V, pH = 6,8 (solución de preparación de las muestras) en proporción 2:1. Se sembraron 25 µg de hTSH, 10 µl de un *pool* de suero humano y se sembró también un patrón de peso molecular compuesto por: 20 µg de anticuerpo IgG₂ (150 kDa), 20 µg de BSA (66 kDa; Sigma-Aldrich) y 20 µg de GST recombinante de *Schistosoma japonicum* (26 kDa). Una vez realizada la corrida electroforética, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) para realizar western blot. Se empleó una solución de transferencia de Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH = 8,3, con el agregado de metanol 20% V/V. La transferencia se realizó durante aproximadamente 2 horas en baño de hielo, a voltaje constante de 100 V. El grado de transferencia se evaluó detectando la presencia de proteínas con solución de Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich) 0,25% P/V en ácido acético al 15% y metanol al 40% V/V. El colorante se eluyó por lavados sucesivos con solución TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 7,5).

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% P/V en PBS durante toda la noche a 4°C con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación con TBS-Tween 20 0,05% V/V, pH =

7,4 (TBS-T) y se incubó 1 hora 30 minutos con el anticuerpo primario (conjugado a biotina) correspondiente. El revelado se realizó con estreptavidina-peroxidasa y la reacción fue visualizada utilizando DAB (Sigma-Aldrich).

Luego de cada etapa se realizaron tres lavados, los cuales consistieron en sumergir la membrana de nitrocelulosa en solución de TBS-T durante 10 minutos con agitación.

3.7. Determinación de los parámetros funcionales de los prototipos B-4 y B-9

– Límite de Detección

El LD de cada inmunoensayo se definió como la mínima concentración de hTSH que puede ser estadísticamente distinguible de un estándar de 0 μ UI/ml. Este valor es la menor cantidad de antígeno que es diferente de cero con un 95% de confianza. La determinación se realizó por curva estándar en ensayos por triplicado.

– Precisión

Se prepararon *pools* de muestras de suero humano con distintas concentraciones de TSH. El coeficiente de variación (%) intra-ensayo e inter-ensayo se calculó a partir de la cuantificación de TSH en las muestras evaluadas por duplicado, en 5 series de ensayos.

– Recuperación

La recuperación se llevó a cabo utilizando muestras de suero eutiroides con valores conocidos de concentración de la hormona, a los que luego se les añadió 0,1, 1,5 o 5 μ UI/ml de hTSH. La recuperación se calculó expresando la cantidad de hTSH determinada por ELISA *sandwich* como un porcentaje de la hTSH total.

4. Resultados y Discusión

4.1. Estudio de matrices para la producción de estándares de calibrado.

Con el fin de obtener una curva de calibrado “propia”, que nos permitiera reemplazar, al menos en parte, la utilización de estándares comerciales, preparamos distintas concentraciones de hTSH (20 – 0,0625 ng/ml) en las matrices proteicas disponibles en nuestro laboratorio. Utilizando el kit comercial U-TSH EIAgen Kit (Adaltis), se cuantificaron diluciones sucesivas de hTSH en PBS-L-T y PBS-BSA-T. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante del kit y en comparación con estándares comerciales.

Como se observa en la Figura 33, ambas matrices proteicas presentaron lecturas similares frente al kit comercial, notándose un incremento de los valores de absorbancia en la matriz de PBS-BSA-T frente a la de PBS-L-T en las concentraciones altas de hTSH (> 1 ng/ml). También se muestran los valores de absorbancia ($\lambda = 450$ nm) obtenidos con el mismo kit pero frente a los calibradores comerciales.

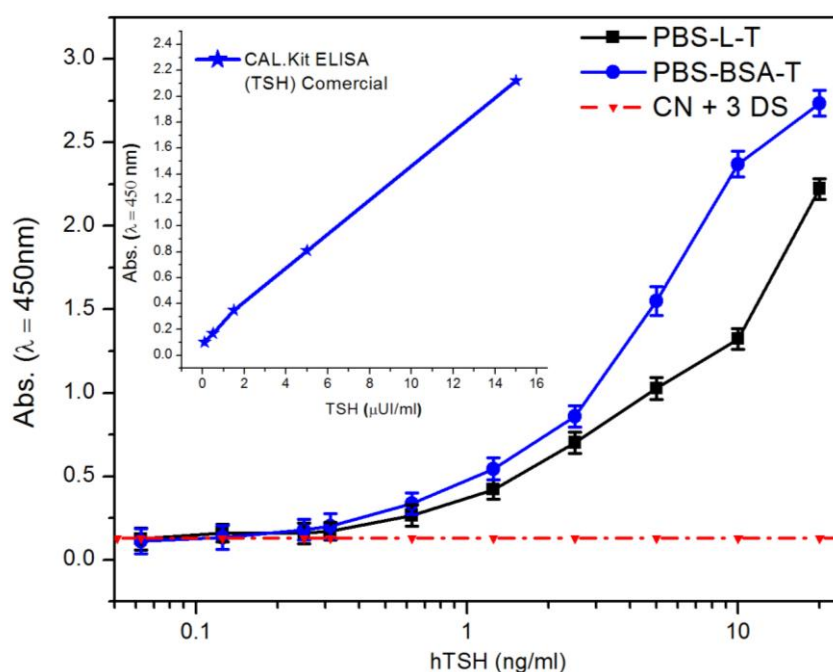


Figura 33: Detección de hTSH en PBS-L-T y PBS-BSA-T con Kit ELISA comercial (CAL. Kit ELISA). Curvas obtenidas a partir de diluciones sucesivas de hTSH (20 – 0,0625 ng/ml) en búfer PBS-L-T y en PBS-BSA-T con el Kit de ELISA comercial.

Sin embargo, PBS-L-T mostró en ensayos posteriores menor desviación y mayor reproducibilidad que PBS-BSA-T. Por lo tanto, para continuar con la selección de pares MAbs y con el desarrollo de inmunoensayos (ELISA e IPCR) para la detección de la

hormona en suero humano, se seleccionó la curva estándar de referencia preparada a partir de diluciones de hTSH entre 10 – 0,1 ng/ml, en PBS-L-T

4.2. Capacidad de detección de bajas concentraciones de hTSH

Se evaluó la capacidad de los prototipos A-1, B-1, C-1, B-4, B-9, C-5 y D-9 para detectar bajas concentraciones de hTSH diluida en búfer PBS-L-T (0,1 ng/ml – 10 ng/ml), en comparación con el kit de ELISA comercial. Como se muestra en la Figura 34, todos los prototipos mostraron performances intermedias, mientras que C-5 y D-9 fueron ineficaces para detectar el antígeno en las concentraciones y bajo las condiciones estudiadas. Por lo tanto, A-1, B-1, C-1, B-4 y B-9 fueron seleccionados para continuar con el trabajo de tesis, mientras que C-5 y D-9 se descartaron.

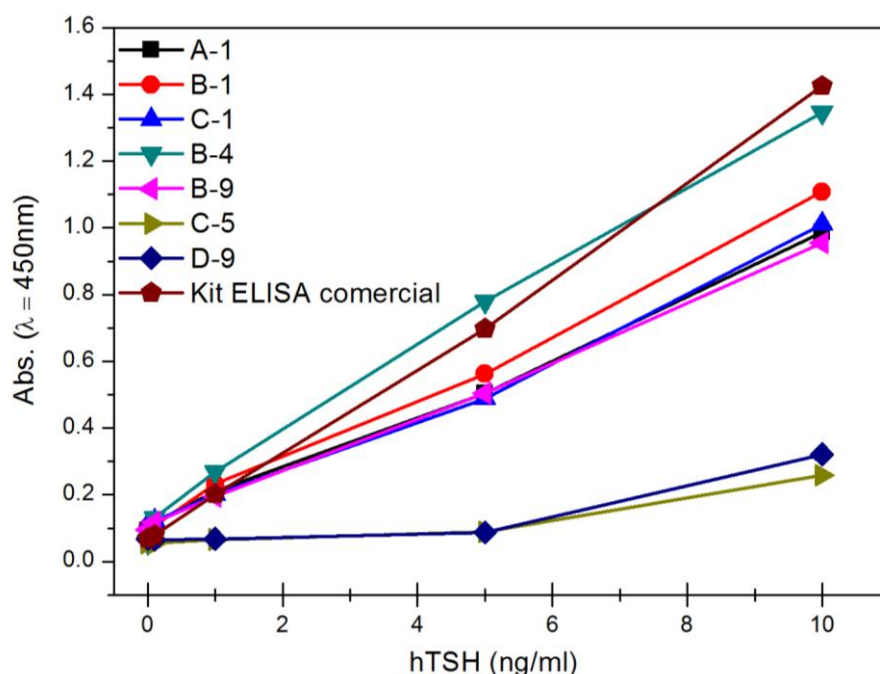


Figura 34: Evaluación de la performance analítica de los pares de MAb para detección de hTSH en bajas concentraciones. Se evaluaron los pares A-1, B-1, C-1, B-4, B-9, C-5 y D-9 en comparación con un Kit comercial de ELISA. La detección del antígeno se evaluó en un rango de concentraciones entre 0,1 y 10 ng/ml diluido en PBS-L-T. Las absorbancias se midieron a $\lambda = 450$ nm (eje de ordenadas) y se graficó en función de la concentraciones de antígeno (eje de abscisas).

4.3. Capacidad de detección en *pooles* de suero humano

Se realizaron ensayos de detección de la hormona en *pooles* de sueros previamente valorados con el U-TSH Kit, EIAgen (Adaltis). En la Figura 35 se puede observar que A-1, B-1 y C-1 poseen una respuesta incremental control negativo (CN) y el pool SH II (2,3 μ UI/ml), pero luego disminuyen y muestran valores bajos e irregulares. Basado en

estos resultados pensamos que estos pares podrían utilizarse en el rango de concentraciones más bajo. Para ello, evaluamos A-1, B-1 y C-1 en el rango de concentraciones comprendidas por 0,45; 1,0; 1,5 y 2,3 $\mu\text{UI/ml}$. Sin embargo, los resultados mostraron una respuesta no lineal (datos no mostrados). En cambio, las absorbancias de B-4 y B-9 aumentaron gradualmente a lo largo de todo el intervalo de concentraciones.

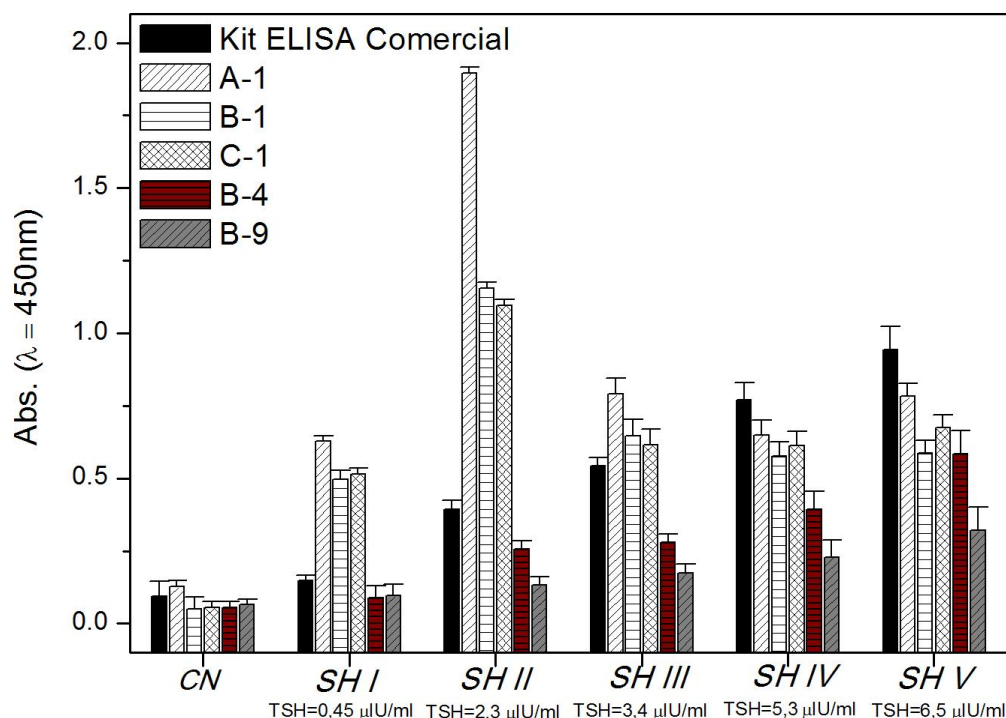


Figura 35: Detección de hTSH por ELISA sandwich en muestras de suero humano. La absorbancia, medidas a $\lambda = 450 \text{ nm}$, se graficó en el eje de ordenadas y las concentraciones de hTSH en el eje de abscisas ($\mu\text{UI/ml}$).

Estos ensayos nos permitieron identificar aquellos pares de anticuerpos (B-4 y B-9) que podrían detectar específicamente el antígeno en su matriz o entorno natural. Muchos de los pares de MAbs que habían sido pre-seleccionados por su buen desempeño (especificidad, límite de detección), presentaron nula o muy baja capacidad de detección del antígeno en las muestras de suero humano. Si bien es evidente, en comparación con el kit comercial, que es mucho menor la sensibilidad lograda con estos pares, aún no han sido optimizadas las condiciones de cada prototipo. Consecuentemente, seleccionamos a B-4 y B-9 para el siguiente paso de la optimización.

4.4. Optimización de las condiciones de ensayos de los prototipos B-4 y B-9

Se estudiaron tanto condiciones que mejoren la capacidad de detección del antígeno como estrategias que redujeran los tiempos operativos del ensayo, con el fin de realizar los ensayos en menos tiempo.

Como se describe en la Tabla 8, B-9 mostró elevada señal inespecífica o de fondo (*background*) con los reactivos de bloqueo PBS-L y PBS-BSA, en ambas temperaturas de incubación (37 °C y TA) y en los dos esquemas operativos evaluados, resultando en ensayos de baja sensibilidad (Tabla 8). En contraposición, el *background* se mantuvo bajo a TA, sin bloqueo y con un esquema de una etapa (1 etapa).

B-4 mostró una mejor performance, con elevada señal específica y bajo *background* con esquema de una etapa y con PBS-BSA como agente bloqueante, a TA (Tabla 8).

Posteriormente se estudió la influencia de la concentración de los anticuerpos de captura y de detección respectivamente. Teniendo en cuenta tanto la señal de *background* como los valores de absorbancia obtenidos, las concentraciones elegidas de MAbs de captura fueron 10 µg/ml para B-9 y 5 µg/ml para B-4, mientras que las concentraciones seleccionadas para los MAbs de detección fueron 1 µg/ml para B-9 y 5 µg/ml para B-4 (Figuras 36 y 37, respectivamente).

Tabla 8: Optimización de las condiciones de ELISA sandwich para B-4 y B-9. Se evaluaron diferentes reactivos de bloqueo (PBS-BSA, PBS-L y Sin bloqueo) y condiciones de temperatura (37°C o RT). Las concentraciones de trabajo del antígeno fueron $S0 = 0$ ng/ml y $S^* = 10$ ng/ml de hTSH diluida en PBS-L-T. Los inmunoensayos se estudiaron en dos esquemas: 1 etapa, donde el MAb de detección (anticuerpo conjugado a biotina) y la muestra son incubadas en forma simultánea (una sola etapa); y 2 etapas, donde la incubación de los reactantes se realiza en etapas separadas e individuales.

		37 °C			Temp. Ambiente (TA)			
Cond. Bloqueo		PBS - BSA	PBS - Leche	Sin bloqueo	PBS - BSA	PBS - Leche	Sin bloqueo	
B-9	Abs. $\lambda=450nm$ S0	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,13 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01	1-etapa
	Abs. $\lambda=450nm$ S*	1,3 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2	
B-4	Abs. $\lambda=450nm$ S0	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03	0,10 \pm 0,01	
	Abs. $\lambda=450nm$ S*	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	
B-9	Abs. $\lambda=450nm$ S0	0,12 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	2-etapas
	Abs. $\lambda=450nm$ S*	0,81 \pm 0,2	0,65 \pm 0,2	0,97 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2	
B-4	Abs. $\lambda=450nm$ S0	0,06 \pm 0,05	0,06 \pm 0,05	0,12 \pm 0,04	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,15 \pm 0,03	
	Abs. $\lambda=450nm$ S*	1,1 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3	

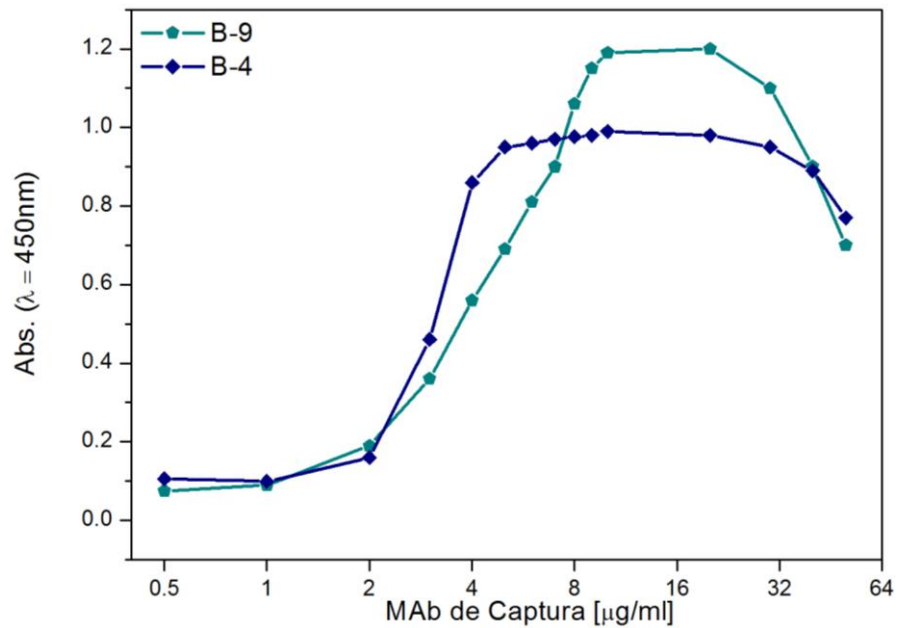


Figura 36: Influencia de las concentraciones de los MAbs de captura. La concentración de trabajo del antígeno fue $S^* = 10 \text{ ng/ml}$ de hTSH diluido en PBS-L-T. Los MAbs de captura se diluyeron en búfer de sensibilización en un rango de concentraciones comprendido entre 0,5 y 50 $\mu\text{g/ml}$. La absorbancia, medida a 450 nm, se graficó en el eje de ordenada y las concentraciones de anticuerpos en el eje de abscisas.

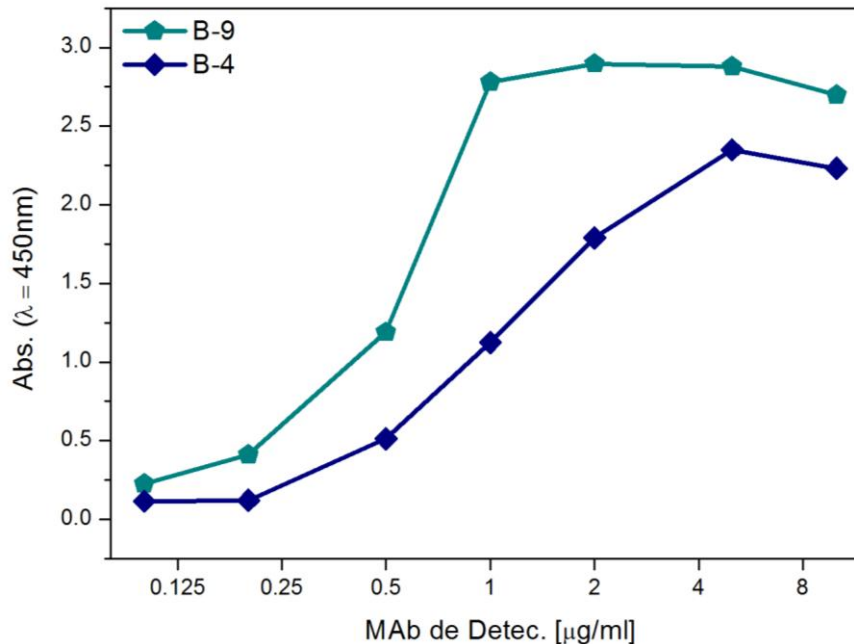


Figura 37: Influencia de las concentraciones de los MAbs de detección. La concentración de trabajo del antígeno fue $S^* = 10 \text{ ng/ml}$ de hTSH diluido en PBS-L-T. Los MAbs de detección (conjugados a biotina) se diluyeron en PBS-BSA-T o PBS-L-T respectivamente, en un rango de concentraciones comprendido entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. La absorbancia, medida a 450 nm, se graficó en el eje de ordenada y las concentraciones de anticuerpos en el eje de abscisas.

Por último, se analizó la relación molar del conjugado enzimático (STV-HRP) con el MAb de detección (conjugado a biotina), debido a que el exceso de cualquiera de los dos inmunoreactantes produce señales inespecíficas. Basado en las absorbancias obtenidas, se seleccionó la dilución 1:1.000 del conjugado enzimático.

Cabe mencionar que, durante el desarrollo de la tesis se evaluaron otros sistemas de generación y amplificación de la señal colorimétrica como la conjugación de los MAb de detección a peroxidasa de rábano picante (HRP) y la utilización del reactivo AMDEX, y también estrategias para favorecer la adsorción y la orientación de los anticuerpos de captura en las microplacas (proteína A y/o neutravidina). Dado que estas estrategias no aportaron mejoras significativas en la capacidad de detección del inmunoensayo o incluso resultaron desfavorables, son descriptas en el Anexo.

4.5. Testeo de ELISA *sandwich* de B-9 y B-4 con calibradores comerciales

Se realizaron ensayos de ELISA *sandwich* utilizando estándares comerciales de TSH (IRP 80/558), en comparación con el kit comercial (Figura 38). B-4 y B-9 mostraron un reconocimiento aceptable del antígeno en los estándares de referencia.

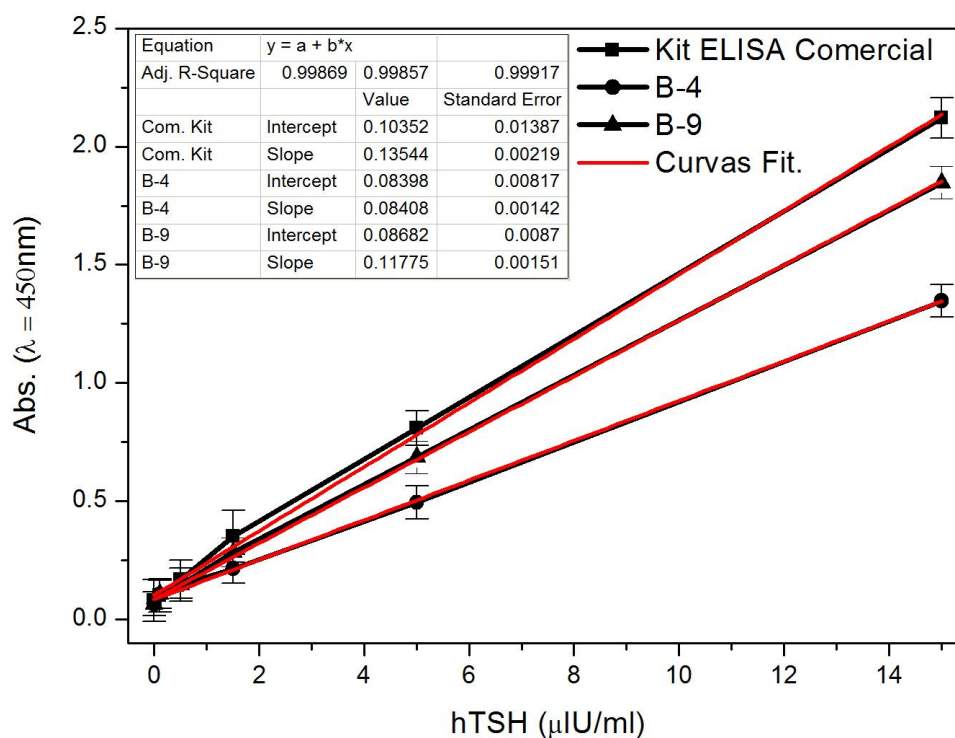


Figura 38: Detección de hTSH por ELISA *sandwich* en calibradores estándares comerciales. Las absorbancias, medidas a $\lambda = 450$ nm, se graficaron en el eje de ordenadas y las concentraciones del antígeno (μ UI/ml) en el eje de abscisas.

La estrategia de incubar en forma simultánea las muestras con el MAb de detección no sólo mejoró la sensibilidad de los prototipos sino que además proporcionó una reducción importante del tiempo total del ensayo, ya que pudimos prescindir de la etapa de bloqueo.

Los resultados demuestran que los prototipos de ELISA *sandwich* B-9 y B-4 poseen una respuesta lineal en todo el rango de concentraciones evaluado. Los valores calculados de LD, definidos como la menor cantidad de antígeno que puede ser distinguido de la muestra en ausencia del mismo (blanco), dentro de un límite de confianza establecido [111], fue de 0,1 μ UI/ml para ambos prototipos. B-9 mostró una pendiente más cercana a la del kit comercial, evidenciando una mejor performance analítica que B-4.

4.7. Evaluación de la especificidad en suero humano

Se evaluó la especificidad en suero de los anticuerpos pertenecientes al prototipo B-9 (M10.B5 y PG.E9), por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Figura 39-A), no desnaturalizantes, seguido de *Western blot* en membrana de nitrocelulosa (Figura 39-B y C).

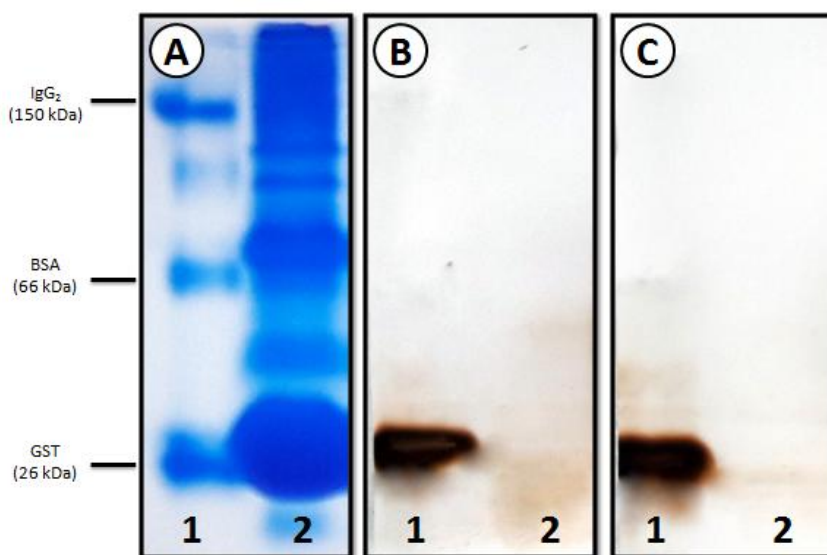


Figura 39: Evaluación de la especificidad de los anticuerpos en suero humano. (A): Separación electroforética en condiciones nativas, no reductoras (PAGE). Se observan las bandas teñidas con el colorante Coomassie Blue. Calle 1: pool de proteínas puras compuestas por IgG₂ (150 kDa), BSA (66 kDa), GST (26 kDa). Calle 2: Pool de suero humano. (B): Western blot utilizando membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo M10.B5 (anticuerpo de captura del par B-9) como anticuerpo primario. Calle 1: control positivo (hTSH). Calle 2: pool de suero humano. (C): Western blot nativo utilizando membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo PG.E9 (anticuerpo de detección del par B-9) como anticuerpo primario. Calle 1: control positivo (hTSH). Calle 2: pool de suero humano.

Las muestras evaluadas fueron suero humano y un control positivo compuesto por hTSH diluida en PBS. El análisis de especificidad se realizó en condiciones nativas dado que los inmunoensayos para la detección cuantitativa de la hormona con fines clínicos se realizan en estas condiciones.

El objetivo fue evaluar la posible interacción inespecífica de los MAbs B-9 con componentes y/o proteínas presentes en el suero humano. En el Western blot puede observarse que tanto el clon M10.B5 (Figura 39-A), anticuerpo de captura del sistema B-9, como el clon PGE9 (Figura 39-B), anticuerpo de detección del sistema B-9, no poseen reacciones de reconocimiento inespecífico con moléculas presentes en la muestras de suero humano evaluadas. Este estudio permitió complementar los estudios de especificidad por ensayos de ELISA sandwich frente a todo el panel de glicohormonas (Ver Capítulo III, 4.8).

4.8. Parámetros funcionales de los prototipos B-4 y B-9.

En la Tabla 9 se describen los parámetros funcionales obtenidos para B-4 y B-9: LD, precisión y recuperación. Puede observarse que con nuestros prototipos obtuvimos parámetros funcionales similares a los del kit comercial.

Tabla 9: Parámetros funcionales de ELISA sandwich B-4 y B-9. Determinación de los parámetros funcionales de los prototipos (B-4 y B-9) de ELISA sandwich para la detección de TSH en muestras de suero humano.

Características Funcionales	LD	Precisión (CV %)		Recuperación (%)
		Intra-ensayo	Inter-ensayo	
B-4	0,1 µUI/ml	> 6,35	> 6,30	94,5 - 102
B-9	0,1 µUI/ml	> 4,15	> 5,75	96,3 - 105

CAPÍTULO V: DESARROLLO
DE UN ENSAYO DE IPCR
SANDWICH PARA LA
DETERMINACIÓN DE TSH
EN SUERO HUMANO

1. Introducción

En un ensayo inmunoquímico tradicional una enzima conjugada a un anticuerpo convierte al sustrato en un producto detectable mediante espectrofotometría, cuya absorbancia se puede correlacionar con la concentración de antígeno presente en la muestra. El aumento en la sensibilidad de un ensayo dado se puede lograr mediante modificaciones en el método de detección o en el sistema de generación de señal.

La reacción de PCR es una técnica analítica que permite una gran amplificación de señal, posibilitando la detección de un pequeño número de oligonucleótidos o moléculas de ácido nucleico. La eficacia de esta técnica se basan en su enorme capacidad de amplificación exponencial de un segmento de ADN mediante oligonucleótidos (*primers*) específicos, obteniendo un elevado número de copias del fragmento amplificado. Por otro lado, la alta especificidad por la secuencia blanco está determinada por el par de *primers*, diseñados de forma de evitar uniones inespecíficas a con otras moléculas de ácidos nucleicos que pudieran estar presentes en las muestras. La técnica de IPCR se basa en la detección de antígenos por anticuerpos específicos con un sistema de generación de señal por PCR [31]. De esta forma, la IPCR combina la versatilidad del ELISA con el poder de amplificación exponencial de las reacciones de PCR. El producto de amplificación generado a partir de un fragmento de DNA unido a un anticuerpo de detección, es proporcional a la cantidad de antígeno detectado. El aumento en el LD y en la sensibilidad posibilita la detección de antígenos en aquellos casos en donde se dispone de escasa cantidad de muestra, matrices complejas, o en casos donde el antígeno se presenta en muy baja concentración, expandiendo la aplicación de los anticuerpos a una amplia variedad de sistemas analíticos. De esta manera, la técnica de IPCR se posiciona como una metodología con alta capacidad de detección, elevada sensibilidad y especificidad.

1.1. IPCR “Universal”

Debido a la gran sensibilidad de la amplificación por PCR, los requerimientos para IPCR son mucho más estrictos que para un ELISA convencional. Son varios los factores a tener en cuenta, siendo dos los más importantes (1) la estrategia para la formación del complejo sonda de ADN – anticuerpo de detección, y (2) el sistema de generación de señal y método de cuantificación del producto de PCR.

El formato más comúnmente utilizado en una amplia diversidad de aplicaciones de IPCR es identificado como IPCR Universal (Figura 40). Este enfoque, inicialmente

descrito en el año 1993 [35,36], hace uso de una combinación de anticuerpos y oligonucleótidos conjugados con biotina y unidos a avidina, sustituyendo la necesidad de utilizar complejos ADN-anticuerpo unidos covalentemente [26]. Como resultado de su versatilidad, los sistemas de avidina-biotina y sus homólogos (estreptavidina-biotina y neutravidina-biotina), se han convertido en uno de los formatos de IPCR más difundido y utilizado actualmente [42,44,69,112,113].

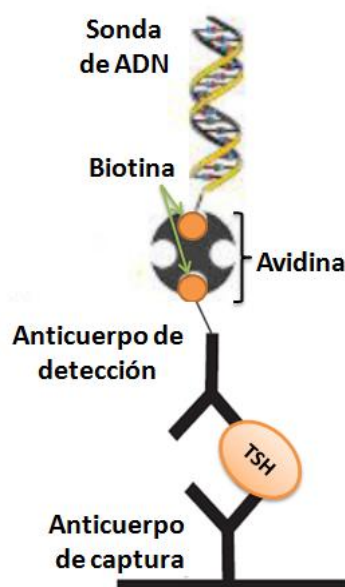


Figura 40: Esquema del formato IPCR Universal a dos centros. Este formato incluye el uso de anticuerpos y sondas de ADN conjugados a biotina, ensambladas por medio de moléculas de avidina.

La principal ventaja de este esquema “universal” es la ausencia de reactivos poco comunes y la omisión de complicados pasos de síntesis y purificación. La necesidad de reactivos y recursos complejos, como los utilizados para la producción de conjugados covalentes de anticuerpo-ADN, pueden ser un obstáculo importante. La disponibilidad de reactivos comerciales *ready to use* han minimizado y simplificado estos problemas [21,61,114]. Actualmente, el acceso a anticuerpos, kits de conjugación a biotina o a grupos reactivos y oligonucleótidos modificados químicamente han facilitado su implementación. Sumado a esto, la síntesis de sondas de ADN puede realizarse mediante PCR preparativa, utilizando oligonucleótidos modificados fácilmente disponibles [115,116].

Para desarrollar el ensayo de IPCR *sandwich* apto para la cuantificación de TSH en suero humano, en el presente trabajo de tesis se adoptó el formato Universal como el que se esquematiza en la Figura 40.

1.2. Diseño de sondas de ADN

Aunque la secuencia de la sonda de ADN se puede elegir libremente, no son pocos los trabajos que describen sondas de ADN originadas a partir de vectores plasmídicos [42,65,70,117,118]. Para el diseño de las sondas es importante seleccionar secuencias de ADN que no sean utilizadas comúnmente en el laboratorio o en ensayos de rutina. La contaminación del lugar de trabajo con la sonda, o con el molde a partir del cual se la sintetiza (vector) pueden afectar los ensayos de IPCR generando una elevada señal de fondo (*background*) o resultados positivos falsos. Además, se debe tener en cuenta el destino del ensayo de IPCR, por lo que es imperativo que la secuencia de ADN elegida no se encuentre en la matriz del antígeno a detectar.

Pocos autores han analizado los factores asociados al diseño de la sonda de ADN y el rendimiento del ensayo de IPCR, como el efecto de la longitud, número de hebras (simple o doble) o las secuencias de los oligonucleótidos de detección. Las sondas de ADN doble cadena presentarían algunas ventajas sobre el de simple cadena: a) la segunda hebra puede mejorar la estabilidad, b) la segunda hebra, al no estar unida al anticuerpo, es liberada a la solución durante el primer ciclo de desnaturalización, permitiendo la replicación sin interferencia estérica y c) el DNA de simple cadena se obtiene a partir de síntesis química limitando su longitud a menos de 100 pares de bases [119].

La producción de sondas de ADN doble cadena de cientos a miles de pares de bases se pueden lograr fácilmente mediante técnicas bioquímicas. Aún teniendo en cuenta estas consideraciones, las diferencias en la eficiencia de amplificación no han evidenciado mejoras en el límite de detección, y la mayoría de las sondas de ADN se encuentran en un rango de 100 - 300 pares de bases, ya que son fragmentos amplificados de manera eficiente por las reacciones de PCR [32].

1.3. Generación de señal y métodos de detección

Para que la técnica de IPCR pueda establecerse como una técnica de rutina se requieren métodos eficientes de análisis y cuantificación del ADN amplificado. Dado que el método se basa en productos de PCR para la cuantificación de antígenos, es imprescindible cuantificar con precisión el producto después de la amplificación de la sonda de ADN por PCR. Como cualquier sistema de diagnóstico, es necesario un adecuado análisis de la señal de detección para asegurar la cuantificación precisa del analito.

En los ensayos de ELISA, la generación de señal se detecta usando un espectrofotómetro luego de la adición de sustratos cromogénicos. En IPCR, el producto de amplificación de la PCR es invisible, y por lo tanto se requieren técnicas diferentes para la detección y cuantificación del antígeno [21]. Se han empleado diferentes formatos para la detección del ADN amplificado siendo la electroforesis en gel de agarosa uno de los métodos inicialmente utilizados. Sin embargo, es un método engorroso si se requiere analizar un gran número de muestras. A su vez, presenta baja sensibilidad si se desea realizar la determinación cuantitativa de un analito.

Por otro lado, se han empleado técnicas de detección de ADN en microplaca, como las técnicas de PCR-ELISA y PCR-ELOSA. Estas técnicas requieren una manipulación adicional de la muestra, asociado a un mayor costo y a un aumento del riesgo de contaminación [120,121].

El desarrollo de la PCR en tiempo real (*real time* PCR), técnica actualmente disponible en muchos laboratorios de análisis bioquímicos, permite la detección de los productos de PCR mientras la reacción de PCR se está llevando a cabo [122]. Uno de los mayores avances fue el uso de los fluoróforos como el *SYBR Green*, que emite fluorescencia al intercalarse en el ADN doble cadena sin inhibir la reacción de PCR. Este reactivo permite la detección de cualquier ADN de doble cadena, con lo que puede ser usado para detectar el producto amplificado. Algo que debe tenerse en cuenta es que tanto productos específicos como no específicos generan señal. En comparación con otras aplicaciones que emplean PCR, como PCR cuantitativa (qPCR) o la retrotranscripción por PCR (RT-PCR), la IPCR es generalmente menos susceptible a los errores asociados a la amplificación de la molécula de ADN blanco. Dado que se emplean varias etapas de lavado antes de la adición de la sonda de ADN, se eliminan todos los contaminantes e inmunoreactivos no unidos. Por esta razón, se reduce considerablemente la posibilidad de competencia con otras secuencias parcialmente homólogas.

Los valores de C_t obtenidos en la reacción de PCR son inversamente proporcionales a la concentración de antígeno. Es decir, los valores más altos de C_t los tendrán los controles negativos (CN). En contraste con esto, la señal de revelado en el ELISA es directamente proporcional a las concentraciones de antígeno, es decir, para los controles negativos tendremos los valores de absorbancia de menor valor numérico. Para lograr una correcta comparación de los datos obtenidos entre los diferentes inmunoensayos (ELISA vs. IPCR) se calcula un “delta de C_t ” (ΔC_t), restando los valores de C_t obtenidos para las muestras individuales de la cantidad total de ciclos realizados en el experimento. Esta

conversión numérica hace posible la comparación directa de los datos y permite estimar de manera cuantitativa el rendimiento de la IPCR [21]. El criterio para diferenciar las señales positivas de las señales de fondo o *background*, son aquellos valores de ΔC_t que superan al correspondiente valor de ΔC_t del control negativo más tres DS. De este modo, el límite de detección (LD) se define como la mínima cantidad del antígeno que puede detectar el sistema y se calcula como la concentración del antígeno correspondiente al valor de ΔC_t determinado mediante la ecuación (7), donde $\Delta C_{t(p)}(CN)$ es el promedio de los ΔC_t del control negativo y DS es la desviación estándar.

$$LD = \Delta C_{t(p)}(CN) + 3 DS \quad (7)$$

1.4. Desafíos

En comparación con técnicas como cromatografía gaseosa (GC), cromatografía gaseosa a alta presión (HPLC) o con técnicas asociadas a espectrometría de masas (MS), la dificultad que implica obtener buena reproducibilidad sigue siendo un factor importante al momento de elegir estrategias de diagnóstico apropiadas. La complejidad intrínseca y el costo de los ensayos de IPCR (reactivos y equipos especiales) y en comparación con ELISA, hace que esta técnica sea menos atractiva, especialmente si no hay ninguna necesidad particular de detección ultrasensible.

Una de las dificultades más comunes de la IPCR es la falta de reproducibilidad debido a la elevada señal de fondo o *background*. La fluorescencia inespecífica presente en las muestras conlleva a una disminución de la sensibilidad en los ensayos de IPCR. El *background* se puede disminuir utilizando bloqueantes adecuados, reactivos y materiales estandarizados y protocolos de lavado optimizados.

Como ocurre con todos los inmunoensayos, otro aspecto que debe ser tenido en cuenta es la calidad funcional de los anticuerpos utilizados. La mayor eficiencia que puede alcanzar un ensayo de IPCR va a depender, en primera instancia, de la eficiencia de los anticuerpos involucrados (K_{aff} , especificidad, avidéz, etc.) [38]. La detección en tiempo real del producto de PCR ha reducido en gran medida el número de problemas asociados a la PCR como sistema de generación de señal de detección, simplificando y acortando los protocolos de IPCR. Un factor determinante para los ensayos de IPCR es el requerimiento de termocicladores compatibles con el material plástico necesario para llevar a cabo los ensayos (placas y *strips*), con capacidad de adsorción de proteínas

(inmunocomplejo) en fase sólida, que pueden no estar fácilmente disponibles. Actualmente, la técnica IPCR se limita a laboratorios bien equipados y con experiencia tanto en inmunoensayos como en tecnologías relacionadas con la PCR.

2. Objetivos

- 1) *Producir y purificar sondas de ADN mono- y bi-biotiniladas.*
- 2) *Verificar la funcionalidad de las sondas de ADN purificadas.*
- 3) *Optimizar las condiciones de reacción de PCR para ensayos de IPCR.*
- 4) *Evaluar tubos de PCR para la adsorción de anticuerpos en fase sólida y la posterior formación del inmunocomplejo de detección de hTSH.*
- 5) *Evaluar la unión de los complejos ADN-neutravidina al inmunocomplejo de captura del antígeno.*
- 6) *Evaluar el prototipo de IPCR sandwich con estándares comerciales preparados en función de la 2^ª Preparación de Referencia Internacional de hTSH (IRP 80/558) de la OMS y en comparación con un kit comercial.*
- 7) *Determinar los parámetros funcionales del prototipo de IPCR sandwich para la detección de TSH en muestras de suero humano.*

3. Materiales y Métodos

En los capítulos anteriores se describió la producción de un panel de MAbs específicos y el desarrollo de un ELISA *sandwich* para la detección de hTSH. Posteriormente se seleccionaron y optimizaron pares de MAbs (prototipos) con capacidad de capturar la hormona en estado nativo y en muestras de suero humano (B-4 y B-9). Debido a las características funcionales obtenidas con B-9, éste fue seleccionado para continuar con el desarrollo de la técnica de IPCR.

3.1. Diseño de oligonucleótidos para PCR / IPCR

Se realizó el estudio de la secuencia genómica del vector de expresión pBluescript SK- utilizando como herramienta el *software* Vector NTI (Invitrogene). Se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos con diferentes fines (Tabla 10):

- a) para la producción de sondas de ADN mono- y bi-biotiniladas
- b) para las reacciones de generación de señal de detección (*real time* PCR) en la de los ensayos de IPCR.

Tabla 10: Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de IPCR. Secuencias de oligonucleótidos específicos utilizados para la generación de sondas de ADN mono-biotiniladas (*Sonda B* y *Sonda C*), para la generación de sondas bi-biotiniladas (*Sonda A*) y oligonucleótidos para la reacción de revelado de la IPCR (oligonucleótidos de detección: *Detec 1*, *Detec 2* y *Detec 3*).

	Nombres	Secuencia	5'	Producto
Sonda A	M13_Foward	GTAAACGACGGCCAG	<i>Biotina</i>	229 pb
	M13_Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>Biotina</i>	
Sonda B	M13_Foward	GTAAACGACGGCCAG	<i>Biotina</i>	246 pb
	pBlues2a.antisense	CGGATAACAATTCACACAG	-	
Sonda C	M13_Foward	GTAAACGACGGCCAG	<i>Biotina</i>	224 pb
	pBlues1a.antisense	GGAAACAGCTATGACCATG	-	
Detec 1	Sens_S	AGCGCGCGTAATACGACTC	-	196 pb
	Antisens_S	ACCATGATTACGCCAAGCG	-	
Detec 2	pBlues2.b.sense	TATAGGGCGAATTGGGTA	-	181 pb
	pBlues2b.antisense	GCTATGACCATGATTACGC	-	
Detec 3	Sens_pBluesc	CCAGTGAATTGTAATACGACTCAC	-	161 pb
	Antisens_pBluesc	AGGGAACAAAAGCTGGG	-	

Las secuencias, tamaño de amplicón y la presencia (o no) de modificaciones 5' de los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla 10. Se diferencian aquellos que fueron diseñados para la producción de sondas de ADN (*Sonda A*, *B* y *C*) de aquellos

que fueron diseñados para la reacción de detección de las mismas (Detec 1, Detec 2 y Detec 3). Todos ellos fueron proporcionados desalinizados y liofilizados por Invitrogen™, en una escala de 10 nM. Los pares de oligonucleótidos modificados fueron diseñados exclusivamente para la producción de sondas de ADN biotiniladas. Como se observa en la Tabla 10, los *primers* poseen en su extremo 5' una molécula de biotina. Ésto permite que, en el proceso de amplificación de ADN, el producto ya se encuentre conjugado con biotina en uno o ambos extremos 5', obteniéndose sondas de ADN biotinilado.

Los oligonucleótidos de detección (identificados como *Detec*) tienen la función de sistema de revelado en los ensayos de IPCR. Estas secuencias están diseñadas de forma tal que hibriden por dentro de las sondas de ADN biotiniladas cuando estas forman parte del inmunocomplejo de captura del antígeno. Cada par de oligonucleótidos de detección hibrida en distintas regiones de las sondas, generando por lo tanto productos de amplificación de tamaño diferentes (Tabla 10).

3.2. Producción de sondas de ADN

Para obtener múltiples copias de ADN conjugado a biotina (ADN biotinilado) se realizaron reacciones de PCR convencional o de punto final, utilizando como molde ADN plasmídico (pBluescript SK-) y los oligonucleótidos descriptos en el punto anterior (Tabla 10).

A partir de un medio saturado de células *E. coli DH5α* transformadas con el vector pBluescript SK-, se realizó la minipreparación de ADN plasmídico empleando el kit comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo con EvaGreen Master Mix Plus (Promega, Biotinyamics), en termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), en un volumen final de reacción de 20 µl. La temperatura de hibridización se estableció de acuerdo a la secuencia de los oligonucleótidos utilizados. Para todas las reacciones de PCR se empleó agua destilada y desionizada (H₂O_{dd}) esterilizada a 121 °C. El perfil de ciclado seguido fue: 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, 15 segundos de hibridización a 57 °C y 15 segundos para extensión a 72 °C, ejecutando 40 ciclos en total. Controles sin ADN plasmídico fueron incluidos en todos los ensayos de PCR para producción de sondas. Luego de 40 ciclos de PCR se realizó una curva de desnaturalización para determinar la especificidad de los productos amplificados. Los

fragmentos amplificados (sondas de ADN biotiniladas) fueron purificados utilizando el sistema QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y posteriormente analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% P/V, en comparación con patrones de tamaño molecular (CienMarker, Biodynaics).

3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis horizontales se realizaron en geles de agarosa 1,5% P/V, utilizando búfer TAE 1X (Tris-acetato 40mM pH = 8, EDTA 1 mM) como solución reguladora de electroforesis. Se empleó como agente revelador GelRedTM (Nucleic Acid Gel Stain, Biotium). Las corridas se realizaron en cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad Power Pac[®] 300 manteniendo voltaje constante a 70 V hasta que el frente de corrida ingresara al gel, aumentándose luego hasta 80 V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Fotodyne Foto/UV 15.

3.4. Funcionalidad de las sondas de ADN purificadas

El objetivo fue evaluar la estabilidad de las moléculas de biotina que forman parte de las sondas de ADN. El análisis se basó en la formación de los complejos pre-incubados (ADN biotinilado-neutravidina) en concentraciones y volúmenes finales que permitieran su posterior análisis por electroforesis en geles de agarosa (10 – 25 µl). Para ello se preincubaron distintas proporciones molares de ADN biotinilado-neutravidina e inmediatamente los complejos formados se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa en presencia de un marcador de peso molecular. Se utilizaron sondas de ADN mono- o bi-biotiniladas (0,7 µM en H₂O_{dd}) y una solución de neutravidina (16 µM en H₂O_{dd}). Las relaciones molares de ADN y neutravidina estudiadas fueron 1:1, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 10:1 y 5:1, respectivamente. El tiempo de preincubación antes de sembrar en gel fue de 3 - 5 minutos a TA. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% con tinción de ADN (SYBR Safe; Thermo Fisher Scientific).

3.5. Evaluación de oligonucleótidos de detección

Se analizaron los *primers* y las sondas de ADN a ser utilizadas en la etapa final de detección del antígeno en los ensayos de IPCR. Se evaluaron las condiciones de ciclado para cada par de oligonucleótidos de detección (Detec 1, Detec 2 y Detec 3) con cada una de las sondas purificadas (Sonda A, Sonda B y Sonda C).

Las reacciones de IPCR se llevaron a cabo en un termociclador de PCR en tiempo real StepOne Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Los reactivos empleados y

las condiciones de reacción fueron las siguientes: Eva Green qPCR Mix Plus 20% (Solis BioDyne, Biocientífica), 20 pM de cada *primer*, diluciones de las sondas de ADN (1:10.000 y 1:100.000) y agua en hasta completar un volumen total de reacción de 20 μ l. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 90 °C durante 15 segundos, hibridización durante 15 segundos, extensión a 72 °C 15 segundos. La identidad de los productos se verificó mediante curvas de *melting* y se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %.

3.6. Mezcla de reacción de la PCR para ensayos de IPCR

Con los oligonucleótidos de detección y sondas de ADN seleccionados para los ensayos de IPCR, se evaluó la eficiencia de la PCR de dos mezclas de reacción en un volumen final de 50 μ l/tubo. Se estudiaron dos proporciones distintas de los reactantes Eva Green y agua (Tabla 11). El ensayo se realizó en comparación con un volumen de reacción (20 μ l) y mezcla de reactivos que ya fueron previamente establecidos en nuestro laboratorio como óptimos.

Tabla 11: Descripción de la composición y las proporciones de los reactantes a ser utilizados en las reacciones de PCR en la etapa de detección de los ensayos de IPCR.

	Mezcla de Reacción		
	A	B	C
AGUA	10 μ l	33 μ l	35 μ l
EVA GREEN	4 μ l	10 μ l	8 μ l
P. Sense	0,5 μ l	1 μ l	1 μ l
P. Antisense	0,5 μ l	1 μ l	1 μ l
ADN (molde)	5 μ l	5 μ l	5 μ l
V. Final	20 μl	50 μl	50 μl

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de PCR en tiempo real (StepOne Real Time PCR System). Los reactivos empleados y las condiciones de reacción fueron las siguientes: Eva Green qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica), oligonucleótidos, diluciones de las sondas de ADN y agua hasta completar volúmenes

de reacción de 20 µl o 50 µl. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos y 35 ciclos de desnaturalización a 90 °C durante 15 segundos, hibridización a 57 °C 15 segundos, extensión a 72 °C 15 segundos. La pureza del producto se confirmó mediante curvas de disociación.

3.7. Evaluación de tubos de PCR para ensayos de IPCR

Con el fin de evaluar la capacidad de adsorción de anticuerpos sobre la superficie de los tubos de PCR disponibles en el laboratorio, se realizó un ensayo de ELISA *sandwich* anti-hTSH bajo las mismas condiciones que en los ensayos en placa de ELISA convencional (poliestireno). El procedimiento se llevó a cabo evaluando dos temperaturas de incubación: 37 °C y 18 – 24 °C (TA).

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): tubos estándar de PCR de diferentes marcas (8-tube strip / MicroAmp[®], Thermo Fisher Scientific y 8-tube strip / Low Profile, Bio-Rad), fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo del MAb anti-hTSH seleccionado (10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de solución de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich) al 1% P/V en PBS pH = 7.5 (Solución de Bloqueo). Se incubó durante 2 horas a 37 °C o TA.
- 3) Antígeno: se agregaron 100 µl/pozo de hTSH (25 ng/ml – 0,1 ng/ml) diluida en una concentración en PBS – Leche 1% - Tween 20 0,05% (PBS-L-T). Se incubó durante 1 hora a 37 °C o TA.
- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 µl/pozo de cada MAb anti-hTSH conjugado a biotina (10 µg/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C o TA.
- 5) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C.
- 6) Revelado: comprende la reacción enzimática con TMB (Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensan 100 µl/pozo del reactivo cromogénico. Se incuba en oscuridad y a TA. La reacción colorimétrica se detiene agregando 100 µl/pozo de Solución *Stop*.
- 7) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado (PBS-T). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

3.8. Interacción de complejos ADN-neutravidina con anticuerpos biotinilados

El objetivo fue evaluar la interacción de los complejos preincubados de sondas de ADN – neutravidina (1:100) con el anticuerpo de detección (conjugado a biotina), constituyentes fundamentales para la generación de señal reportera en los ensayos de IPCR (PCR de detección). Para ésto se llevaron a cabo ensayos de ELISA *sandwich* en el cual se bloquean los sitios de unión/interacción del MAb biotinilado con el reactivo estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (reacción testigo), por medio de la incubación previa con complejos preformados de sondas ADN-biotina:neutravidina. El procedimiento se llevó a cabo, como se describe a continuación, por medio de ELISA *sandwich* en tubos de PCR seleccionados en etapas previas.

- 1) Sensibilización (anticuerpo de captura): tubos estándar de PCR (*8-tube strip*/MicroAmp[®], Thermo Fisher Scientific) fueron sensibilizados con 100 µl/pozo del MAb anti-hTSH seleccionado (10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó ON a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de solución de BSA (Sigma-Aldrich) al 1% P/V en PBS pH = 7,5 (Solución de Bloqueo). Se incubó durante 2 horas a 37 °C o TA.
- 3) Antígeno: se agregaron 100 µl/pozo de hTSH en PBS-L-T (10 ng/ml). Se incubó durante 1 hora a 37 °C o TA.
- 4) Anticuerpo Secundario (anticuerpo de detección): se agregaron 100 µl/pozo de cada MAb anti-hTSH biotinilado (10 µg/ml en solución diluyente). Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C o TA.
- 5) Complejos de ADN-biot/neutravidina: Se agregaron 100 µl/pozo de los complejos preformados de ADN mono- o bi-biotinilado y neutravidina (1 mg/ml) (relación molar 1:100), diluidos 1:2.000, 1:10.000 y 1:100.000 en PBS-BSA-T o PBS. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C.

- 6) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de STV-HRP (Sigma-Aldrich) diluida 1:1.000 en solución diluyente. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C.
- 7) Revelado: Luego del lavado, se dispensan 100 µl/pozo del reactivo cromogénico TMB (Sigma-Aldrich). Se incubó en oscuridad y a TA. La reacción colorimétrica se detuvo agregando 100 µl/pozo de Solución *Stop*.
- 8) Controles: (-) La muestra fue reemplazada por solución diluyente de la sonda
 (-) Se hizo un control de inhibición de la interacción usando diluciones de una solución de neutravidina (1 mg/ml).
 (+) ELISA *sandwich* sin exposición a los complejos ADN:neutravidina.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado (PBS-T).

3.9. Detección de hTSH por IPCR *sandwich*

Los ensayos de IPCR se realizaron con los mismos anticuerpos de captura y detección usados en los ensayos de ELISA *sandwich* (prototipo B-9). Los tubos de PCR (MicroAmp®, Thermo Fisher Scientific) fueron sensibilizados utilizando 50 µl/pocillo del MAb de captura (10 µg/ml) en búfer bicarbonato a pH = 9,6 e incubados ON 4 °C. Después de lavar con PBS-T, se agregaron 50 µl de diluciones seriadas del antígeno (hTSH) en un rango de concentraciones comprendido entre 100 y 0,01 ng/ml en PBS-L-T. Junto con el antígeno, en simultáneo, se agregó a cada pocillo, 50 µl del MAb de detección (volumen final: 100 µl) y se incubaron durante 2 horas a TA. Los tubos se lavaron y se añadieron 50 µl de complejos pre-ensamblados de ADN-neutravidina (1:100) diluido a 1:2000 en PBS. Los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Luego los tubos se lavaron 5 veces con PBS-T y 10 veces con agua destilada. Finalmente se procedió con la reacción de PCR para la generación de señal de detección en tiempo real. La reacción de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones de reacción: 20% de Eva Green qPCR Mezcla Plus (Solis BioDyne, Biocientífica), 20 pM de cada *primer* de detección, 75% de agua en un volumen total de 50 µl. El perfil de ciclado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 90 °C (10 segundos), hibridación a 57 °C (15 segundos) y extensión a 72 °C (15 segundos). Las curvas de amplificación se analizaron con *software* de sistema de detección de secuencias (StepOne). La pureza del producto se confirmó mediante curvas de disociación y los productos de PCR se analizaron por

electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% con tinción de gel de ADN (SYBR Safe; Thermo Fisher Scientific). Se incluyó un control negativo de la reacción de IPCR (CN IPCR), el cual no lleva antígeno. Todas las muestras estudiadas se realizaron por duplicado. Controles negativos de la mezcla de reacción (CN PCR) fueron incluidos en todos los ensayos de IPCR *sandwich*.

3.10. Evaluación del ensayo de IPCR *sandwich* con estándares comerciales

Se evaluó en su capacidad de detectar la hormona presente en estándares comerciales preparados según la 2° Preparación de Referencia Internacional de hTSH (IRP 80/558) de la OMS.

El protocolo optimizado de IPCR *sandwich* para la detección de hTSH en muestras de suero humano y/o estándares es el siguiente (se omiten etapas de lavado):

- 1) Sensibilización con MAbs de captura en búfer carbonato pH = 9,6. V_f: 100 µl, ON, 4 °C.
- 2) Muestra + MAbs de detección conjugado a biotina. V_f: 100 µl. Incubación 2 horas a temperatura ambiente (18 – 24 °C).
- 3) Complejos pre-ensamblados de sonda de ADN: neutravidina (1:100). V_f: 50 µl – Incubación 30 minutos a 37 °C.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de PBS-T y antes de pasar a la reacción de PCR en tiempo real se efectuaron 10 lavados suaves con H₂O_{dd} estéril.

- 4) Se dejan secar cuidadosamente los tubos (3-5 minutos) y se procede con la reacción de PCR en tiempo real, con un volumen final de mezcla de reacción de 50 µl/tubo, como se describe a continuación:
 - 40 µl de H₂O_{dd} estéril
 - 8 µl de Eva Green
 - 1 µl de cada oligonucleótido de detección (*sense* y *antisense*)

Controles:

- Control negativo de IPCR (NC IPCR): tubos sin antígeno.
 - Control negativo de PCR (NC PCR): tubos sin sonda de ADN (sin ADN molde).
- 5) Protocolo de ciclado para la reacción de PCR (35 ciclos)
 - Desnaturalización a 95 °C, 15 segundos.

- Hibridización a 57 °C, 15 segundos.
- Extensión a 72 °C, 15 segundos.

Luego de 35 ciclos de PCR se realizó una curva de desnaturalización para determinar la especificidad del producto.

3.11. Evaluación de la especificidad en muestras de suero humano

Para determinar la especificidad de la reacción de IPCR *sandwich* en muestras de suero humano, se añadió hTSH, r-FSH, hLH o hCG (10 ng/ml) a *pooles* de suero, cuyo valor endógeno de TSH (2,85 μ UI/ml) se midió previamente mediante un kit comercial (kit U-TSH EIAgen, Adaltis). El protocolo de IPCR fue el mismo descripto anteriormente.

3.12. Determinación de los parámetros funcionales del ensayo de IPCR

– Límite de Detección

El LD se definió como la mínima concentración de hTSH que puede ser estadísticamente distinguible de un estándar de 0 μ UI/ml. Este valor corresponde a la menor cantidad de antígeno que es diferente de cero con un 95% de confianza. La determinación se realizó por curva estándar en ensayos por triplicado.

– Precisión

Se prepararon *pooles* de muestras de suero humano con distintas concentraciones de TSH. El coeficiente de variación (%) intra-ensayo e inter-ensayo se calculó a partir de la cuantificación de TSH en las muestras evaluadas por duplicado, en 5 series de ensayos.

– Recuperación

La recuperación se llevó a cabo utilizando muestras de suero eutiroides con valores conocidos de concentración de la hormona, a los que luego se les añadió 0,1, 1,5 o 5 μ UI/ml de hTSH. La recuperación se calculó expresando la cantidad de hTSH determinada por IPCR *sandwich* como un porcentaje de la hTSH total.

4. Resultados y Discusión

4.1. Producción y purificación de sondas de ADN mono y bi-biotiniladas.

Se produjeron sondas conjugadas a biotina en uno de los extremos 5' (Sonda B y Sonda C) y conjugadas a biotina en ambos extremos 5' (Sonda A). La producción se realizó por reacciones de PCR de punto final, utilizando pares de oligonucleótidos descriptos en la Tabla 10 y el plásmido pBluescript SK⁻ como ADN molde. Controles sin ADN plasmídico fueron incluidos en todos los ensayos de PCR de producción de sondas. Se observa en la Figura 41 la detección en tiempo real de los productos de PCR por fluorescencia. La señal reportera es normalizada y graficada en función del número de ciclos (eje de abscisas).

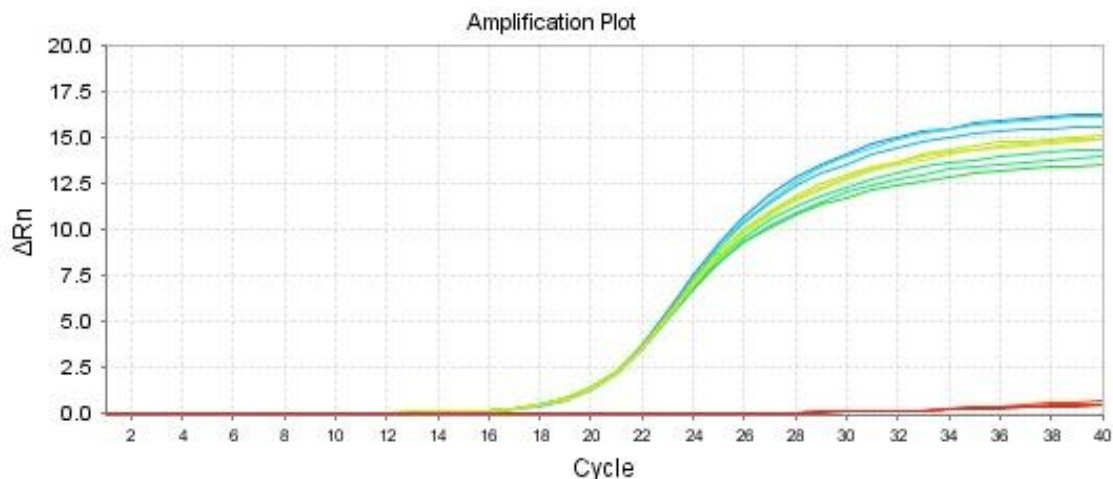


Figura 41: Curvas de amplificación en la producción de sondas de ADN mono- y bi-biotinilado por reacción de PCR punto final utilizando oligonucleótidos conjugados a biotina en los extremos 5'. Se grafica la detección por fluorescencia en tiempo real de los productos de PCR por fluorescencia. La señal reportera es normalizada y graficada en función del número de ciclos (eje de abscisas).

La identidad de los amplicones fue determinada por curva de Melting (Figura 42, A) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Figura 42, B).

Posteriormente, para la obtención de las sondas puras se procesaron los productos crudos de las reacciones de PCR con el kit comercial *QIAquick PCR* (Qiagen). El producto purificado fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% (Figura 42, B). Como se observa en la Figura 42-B, las bandas de los productos purificados a partir de la mezcla de reacción de la PCR y en comparación con patrones de tamaño molecular, se corresponden con los tamaños moleculares correspondientes a las sondas de ADN mono- y bi-biotiniladas esperadas (Sonda A, 229 pb; Sonda B, 246 pb; Sonda C, 224 pb).

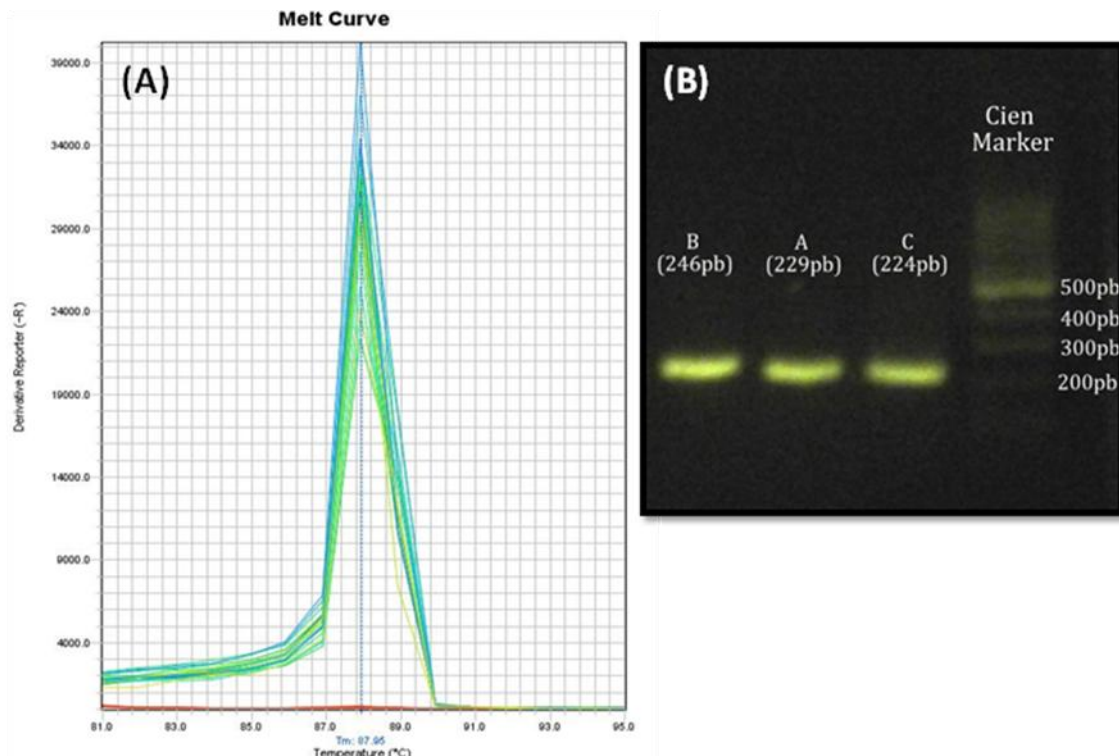


Figura 42: Evaluación de la identidad de las sondas de ADN. (A) Evaluación por curva de Melting del producto obtenido en las reacciones de PCR para la producción de sondas. (B) Análisis en gel de agarosa (1,5% P/V) de los fragmentos de ADN purificados (Sondas A, B y C) en presencia de un marcador de tamaño molecular.

4.2. Funcionalidad de sondas de ADN (purificadas)

La alta afinidad de la interacción no covalente entre la biotina y la estreptavidina forma la base de muchos ensayos de diagnóstico [33]. Por otro lado, el concepto de formación de complejos autoensamblados utilizando ADN biotinilado y STV, ha sido experimentalmente demostrado por Niemeyer y colaboradores [49,123,124].

Aquí hemos estudiado, por electroforesis en geles de agarosa, la formación de complejos supramoleculares obtenidos a partir del autoensamblaje de las sondas de ADN mono- y bi-biotiniladas con moléculas de neutravidina (tetraivalente).

Por otro lado, un factor crítico en la obtención de sondas puras es el proceso de purificación de las mismas, ya que condiciones químicas severas asociadas a los solventes utilizados pueden inactivar la molécula de biotina inhibiendo la posterior interacción con la molécula de avidina (STV o neutravidina).

En la Figura 43 se pueden observar las diferentes estructuras supramoleculares formadas a partir de sondas de ADN mono-biotiniladas o bi-biotiniladas pre-incubadas con neutravidina (tetraivalente para biotina) en distintas relaciones molares (1:1 – 1:100

– 10:1). La presencia de estructuras complejas compuestas por dos o más sondas de ADN por cada molécula de neutravidina, se evidencian por la presencia de bandas de diversos pesos moleculares.

Con la sonda mono-biotinilada se observan bandas individuales o discretas de los complejos supramoleculares formados (Figura 43, A). Se destaca la reducción en la cantidad de estructuras de diversos tamaños moleculares a medida que la relación molar entre las sonda de ADN y neutravidina se incrementa de 1:1 a 1:100. En el carril correspondiente a la relación molar 1:100 se observa que la diversidad de estructuras llega a un mínimo, evidenciando la prevalencia de un complejo homogéneo de 450 pb aproximadamente. El tamaño de esta estructura se correspondería al de dos sondas de ADN-monobiotinilada (224 pb) por cada molécula de neutravidina. En cambio, en los carriles de proporciones 10:1 y 5:1, se observan bandas individuales de bajo peso molecular compatibles con una sonda por cada molécula de neutravidina, evidenciando la ausencia de complejos supramoleculares de mayor peso molecular.

Para la sonda bi-biotinilada (Figura 43, B) no se observan bandas discretas de los complejos supramoleculares formados, a excepción de las fracciones donde la proporción molar de ADN es mayoritaria (10:1 y 5:1). En los carriles de relaciones molares 1:10, 1:20 y 1:50 se observa un “chorreado” a partir de los 500 pb que corresponderían a distintas estructuras poliméricas de ADN-neutravidina compuestas por tres o más moléculas de ADN bi-biotinilado por cada molécula de neutravidina. Si bien a medida que aumenta la relación ADN-neutravidina se puede observar que hay una tendencia a formar complejos más homogéneos (1:100), estos siempre se mantienen por arriba de los 500 pb y sin tendencia a formar complejos supramoleculares predominantes. Dada las características de los complejos supramoleculares formados con las sondas de ADN con moléculas de neutravidina, seleccionamos la relación molar 1:100 para ser utilizada en los ensayos de IPCR. En esta condición se observa que, para ambas sondas (mono- y bi-biotinilada), hay una mayor tendencia a formar complejos homogéneos y reproducibles, con sitios libres en la molécula de neutravidina para la posterior interacción con el anticuerpo (biotinilado).

Además, en base a estos resultados establecimos que las moléculas de biotina presentes en las sondas de ADN purificadas (sondas mono- y bi-biotiniladas), mantuvieron la capacidad de unión a las moléculas de neutravidina y que son aptas para continuar con el desarrollo de la técnica de IPCR.

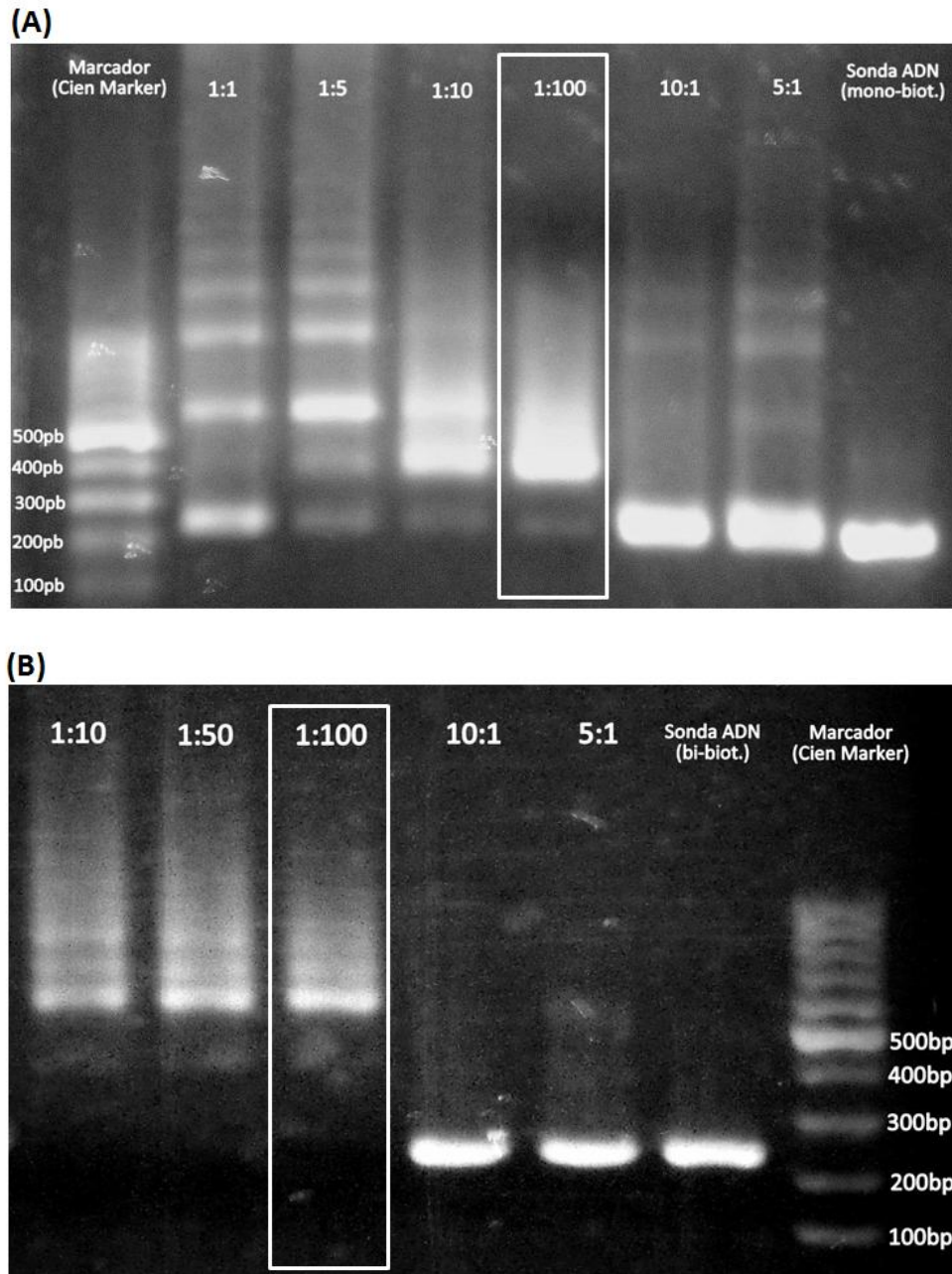


Figura 43: Complejos autoensamblados de sondas de ADN y neutravidina. **(A)** Análisis de los complejos autoensamblados de ADN mono-biotinilado con neutravidina. La primera calle contiene el marcador de peso molecular de ADN y las siguientes líneas contienen mezclas de sonda de ADN mono-biotinilada (224pb) con diferentes cantidades de neutravidina. Las relaciones molares relativas se indican en la parte superior de las líneas (ADN-neutravidina). La última línea contiene sonda de ADN mono-biotinilada sin neutravidina. **(B)** Análisis de los complejos autoensamblados de ADN bi-biotinilado con neutravidina. Las primeras líneas contienen mezclas de sonda de ADN bi-biotinilada (229pb) con diferentes cantidades de neutravidina y la última calle contiene el marcador de peso molecular de ADN. Las relaciones molares relativas se indican en la parte superior de las líneas (ADN-neutravidina). La anteúltima línea contiene sonda de ADN bi-biotinilada sin neutravidina.

4.3. Evaluación de los oligonucleótidos de detección

Se llevaron a cabo reacciones de *real-time* PCR con el fin de evaluar los *primers* de detección (Tabla 10), las condiciones de ciclado y la complementariedad con las sondas de ADN purificadas. Cada uno de los pares de *primers* de detección (Detec 1, 2 y 3) fue evaluado con cada una de las sondas purificadas (Sonda A, B y C). Las reacciones se realizaron por duplicado, para dos diluciones de sondas (1:10.000 y 1:100.000), en un volumen final de 20 μ l. Controles sin ADN molde (CN PCR) fueron incluidos en los ensayos de PCR. Se muestra en la Figura 44 la detección en tiempo real de los productos de PCR por fluorescencia. La señal reportera es normalizada y graficada en función del número de ciclos (eje de abscisas). Estos resultados permitieron establecer tanto las condiciones óptimas de ciclado (desnaturalización a 95 °C, 15 segundos; hibridización a 57 °C, 15 segundos; extensión a 72 °C, 15 segundos) así como la especificidad de los *primers* de detección a ser utilizados en las etapas de generación de señal de los ensayos de IPCR.

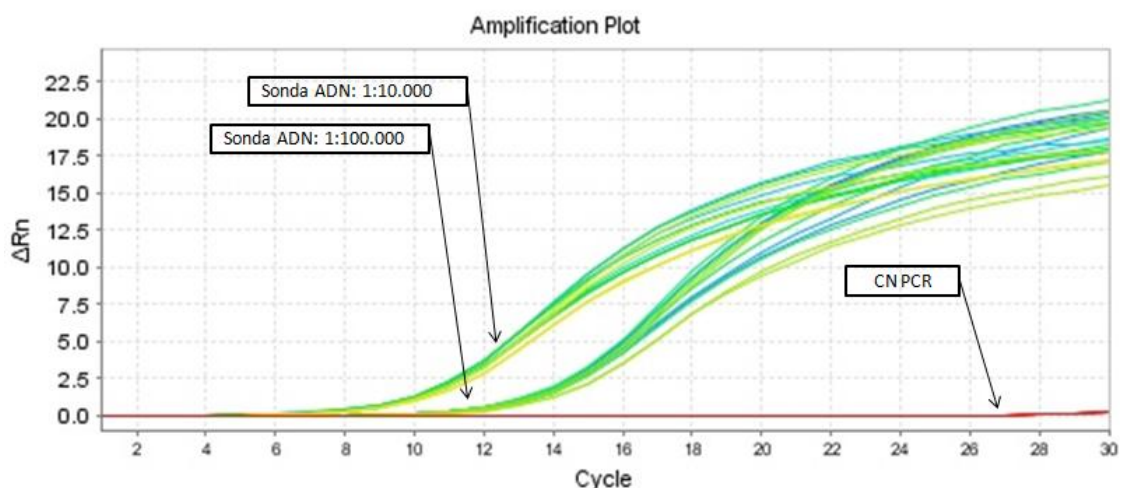


Figura 44: Evaluación de oligonucleótidos de detección y de sondas de ADN purificadas. Se evaluaron las sondas de ADN mono- y bi-biotiniladas purificadas, por reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos de detección descritos en la Tabla 10. Se grafica la detección por fluorescencia en tiempo real de los productos de PCR por fluorescencia. La señal reportera es normalizada y graficada en función del número de ciclos (eje de abscisas).

4.6. Mezcla de reacción de PCR para ensayos de IPCR

En base a la bibliografía y a ensayos propios el volumen óptimo de reacción en la etapa de generación de señal de los ensayos de IPCR es de 50 μ l. Volúmenes menores incrementan la variabilidad entre las replicas. Para un volumen final de 50 μ l se estudiaron dos concentraciones de reactantes (Tabla 11) y se verificó la eficiencia de la

reacción de amplificación en comparación con una mezcla de reacción estándar de volumen final 20 μl (Figura 45).

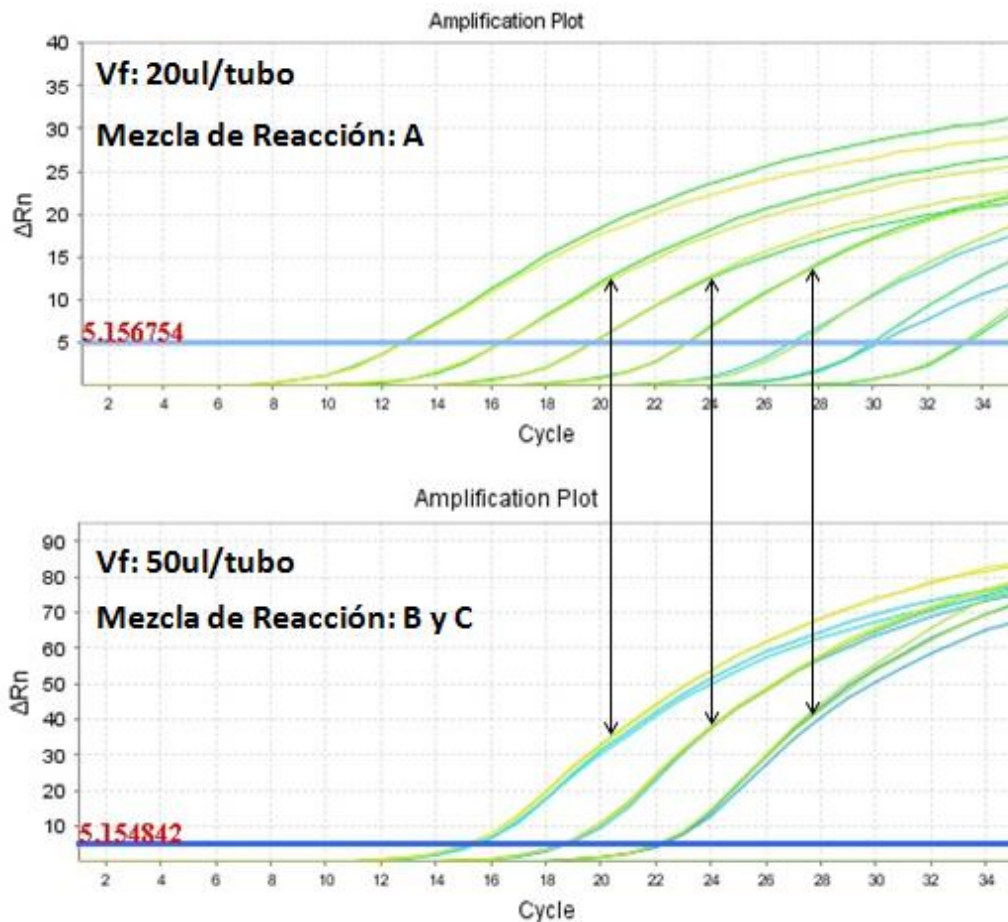


Figura 45: Comparación de la eficiencia de reacción de PCR en volúmenes de reacción 20 y 50 μl . Se grafica la detección por fluorescencia en tiempo real de los productos de PCR. La señal reportera es normalizada y graficada en función del número de ciclos (eje de abscisas). No se observa diferencia significativa en los volúmenes de reacción ensayados, para ambas mezclas de reacción. Se marcan con flechas las curvas correspondientes a diluciones del ADN molde 1:10.000, 1:100.000 y 1:1.000.000.

Las reacciones se realizaron por duplicado, para diluciones seriadas de sonda a partir de 1:10.000 y volúmenes finales de reacción de 20 y 50 μl . Como se observa en la Figura 45, no se detectaron diferencias significativas en las curvas de amplificación para los volúmenes de reacción ensayados, ni para las mezclas de reacción evaluadas. Se marcan con flechas las curvas correspondientes a diluciones del ADN molde 1:10.000, 1:100.000 y 1:1.000.000. De esta forma pudimos concluir que es factible usar la menor proporción del reactivo *Eva Green* en las reacciones de PCR realizadas en un volumen final de 50 μl .

4.5. Evaluación de tubos de PCR

Tradicionalmente el ELISA se ha basado en la adsorción pasiva de antígenos o anticuerpos en la superficie de tubos o pocillos de poliestireno los cuales, en el proceso de fabricación, han sido tratados para conferirle características hidrofílicas. Esta cualidad se consigue por medio de la oxidación de las moléculas de estireno, resultando en grupos oxidrilos (-OH) y/u oxígeno-carbonilos (=O) expuestos en la superficie. El grado de oxidación de la superficie determina la naturaleza y el grado posterior de adsorción de los reactantes. Por el contrario, los tubos utilizados para las reacciones de PCR son comúnmente de polipropileno o de policarbonato, básicamente por su gran resistencia a los cambios de temperatura. A diferencia de los materiales utilizados para inmunoensayos, estas superficies no se encuentran acondicionadas para la adsorción pasiva de biomoléculas.

Un factor común es que los materiales plásticos utilizados tanto en placas de ELISA como en tubos o placas de PCR son de naturaleza hidrofóbica y las moléculas que deben ser unidos en ellos son parcialmente hidrofílicas. Antígenos y anticuerpos presentan diferentes áreas (dominios, epitopes) con comportamiento hidrofóbico o hidrofílico, que bajo diferentes condiciones de sensibilización (pH, fuerza iónica) pueden establecer interacciones pasivas con la superficie hidrofóbica de los tubos utilizados para PCR. Con el propósito de evaluar la capacidad de adsorción de los anticuerpos de captura sobre la superficie de los tubos de PCR, se realizaron ensayos de ELISA *sandwich* en soportes compatibles con el termociclador a utilizar (Figura 46; **A**: 8-tube strip / Low Profile, Bio-Rad y **B**: 8-tube strip / MicroAmp®, Thermo Fisher Scientific). El procedimiento se llevó a cabo en las mismas condiciones que un ELISA *sandwich* convencional.

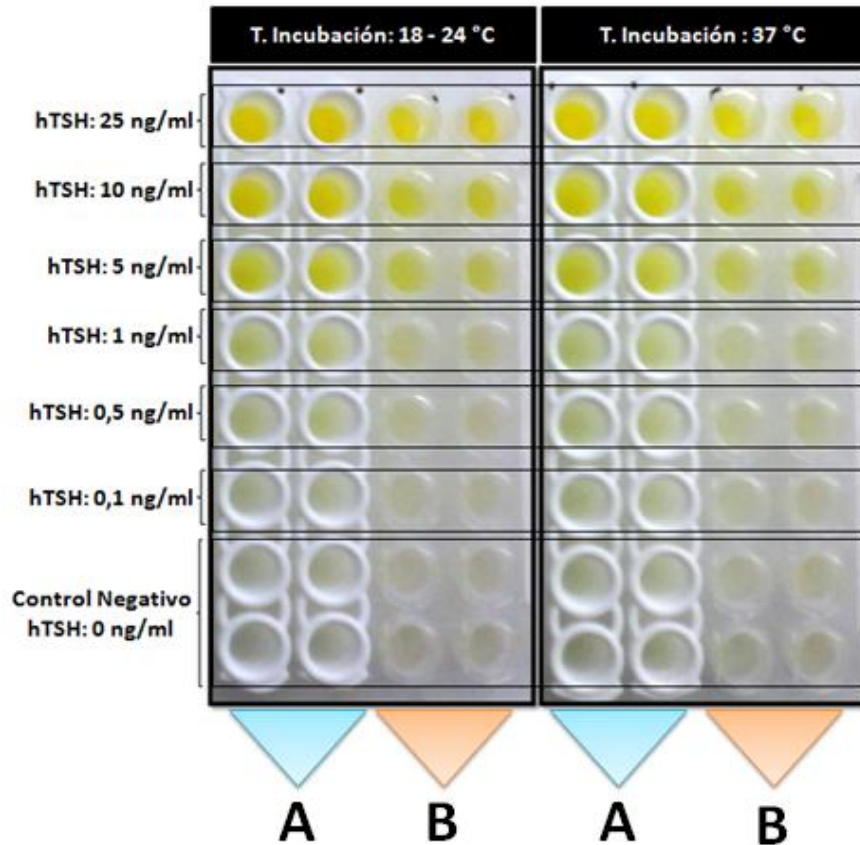


Figura 46: Evaluación de tubos de PCR convencionales para ensayos de IPCR sandwich. Vista superior del ensayo de ELISA sandwich realizado en tubos de PCR. Visualmente se puede distinguir reacción positiva hasta una dilución del antígeno de 1 ng/ml en PBS-L-T en ambas marcas de tubos (A: 8-tube strip / Low Profile, Bio-Rad; B: 8-tube strip / MicroAmp®, Thermo Fisher Scientific), y en ambas condiciones de temperatura evaluadas.

En la Figura 46 se puede observar una imagen tomada del ensayo de ELISA *sandwich* contra hTSH realizado en los tubos de PCR. Visualmente se puede apreciar una reacción positiva evidente hasta 1 ng/ml de hTSH. No se observó reacción en los tubos de control negativo de las dos marcas de tipos de tubos evaluados. El ensayo permitió determinar la factibilidad de la formación del inmunocomplejo en los tubos de PCR. Además se observó que, en ambas tipos de tubos, no hubo variaciones en la eficiencia del inmunoensayo en función de las temperaturas ensayadas. Los resultados permitieron establecer, al menos en forma cualitativa, que el anticuerpo de captura puede adsorberse sobre la superficie de tubos de PCR convencionales y no se encontraron diferencias entre las diferentes marcas de tubos ni entre las condiciones estudiadas.

4.6. Unión del complejo ADN-neutravidina al anticuerpo de detección

En etapas anteriores se evaluó la funcionalidad de las sondas de ADN (mono- y bi-biotiniladas), se optimizaron las condiciones de reacción de PCR con los oligonucleótidos de detección y se realizaron ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH en tubos de PCR para determinar la factibilidad de formación del inmunocomplejo en la superficie de los tubos. Luego, nuestro objetivo fue determinar la efectiva interacción de entre las moléculas de neutravidina de los complejos preformados con sondas de ADN, y los anticuerpos de detección biotinilados. Para ésto se tuvieron en cuenta tres aspectos centrales:

- 1) La concentración de las sondas de ADN afectan la señal de *background*. Debido a que a mayor cantidad de sonda se genera mayor señal inespecífica [42], buscamos trabajar con la menor concentración posible de ADN.
- 2) Si bien la concentración de ADN (sonda) debe ser la menor posible para evitar el incremento de señal inespecífica, la interacción neutravidina-anticuerpo de detección (biotinilado) debe ser la máxima posible. Para esto se determinó la mayor dilución de complejos ADN-biot:neutravidina que bloquea eficientemente los sitios de unión/interacción del MAb biotinilado con el reactivo STV-HRP.
- 3) Determinar si el búfer de dilución (PBS-BSA-T) condiciona la interacción con el anticuerpo de detección.

En primer lugar establecimos la concentración de complejos ADN-neutravidina que logran bloquear eficientemente la reacción cromogénica de una reacción testigo dada por una cantidad fija de unión de STV-HRP al anticuerpo de detección (MAb biotinilado). En la Figura 47 se muestran los ensayos donde se evalúa el efecto del agregado de distintas diluciones en PBS de los complejos ADN-neutravidina (A = 1:2.000; B = 1:10.000 y C = 1:100.000) a ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH en tubos de PCR. En estos ensayos se trabajó con una sola concentración de antígeno (10 ng/ml); en paralelo se realizó un ELISA *sandwich* control con el fin de verificar que la inhibición de la reacción testigo era debido a la unión de los complejos ADN-neutravidina y no a otros factores.

Como se puede observar, la dilución del complejo autoensamblado de ADN-biotina y neutravidina que bloquea eficientemente la interacción del anticuerpo de detección (MAb conjugado a biotina) con STV-HRP es 1:2.000, evidenciado por la ausencia de

color amarillo en estos pocillos. En esta dilución la concentración final de neutravidina es de 1,12 $\mu\text{g/ml}$, la cual es coherente con resultados previamente obtenidos y recientemente publicados por nuestro grupo [113]. Por otro lado, no se observaron diferencias entre las sondas utilizadas (mono- o bi-biotinilada) para la formación de los complejos.

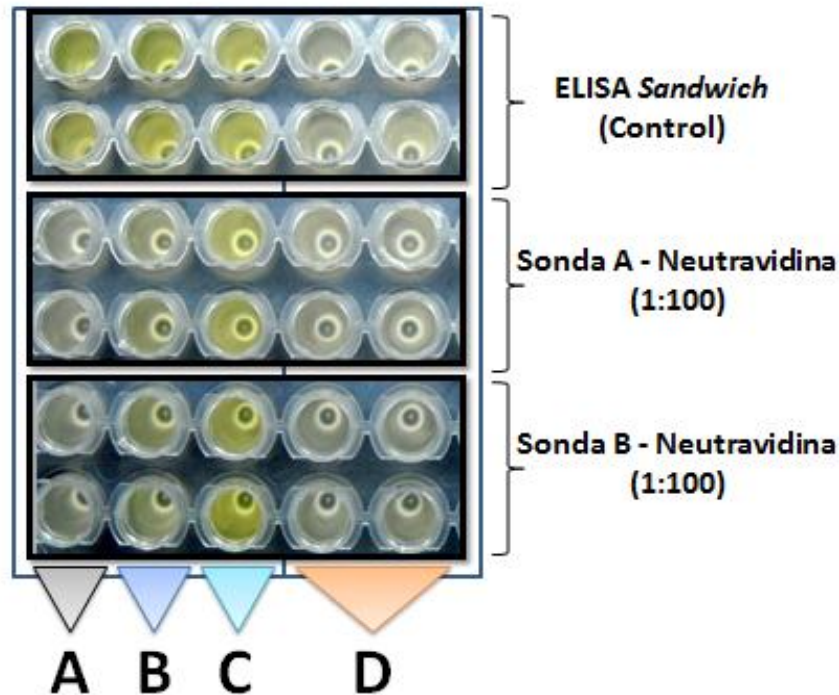


Figura 47: Interacción ADN-neutravidina y MAbs biotinilados. Vista superior del ensayo de ELISA sandwich realizado en tubos de PCR para el estudio de diluciones de complejos preformados de sondas de ADN biotinilado con neutravidina. Visualmente se puede distinguir reacción positiva (coloración amarilla) a partir una dilución del complejo en 1:10.000 (B y C), para ambas sondas estudiadas (Sonda A: bi-biotinilada; Sonda B: mono-biotinilada). La reacción colorimétrica es inhibida en su totalidad cuando la dilución de los complejos ADN-biotina y neutravidina es 1:2.000 (A). A: ADN-neutravidina = 1:2.000. B: ADN-neutravidina = 1:10.000. C: ADN-neutravidina = 1:100.000. D: Control negativo del inmunoensayo ($hTSH = 0$).

Posteriormente se evaluó la posible interferencia del búfer PBS-BSA-T, usado como solvente de los complejos autoensamblados de ADN-biotina y neutravidina. El objetivo fue determinar si este búfer, comúnmente utilizado en los ensayos de ELISA, podría afectar positiva o negativamente la interacción del complejo ADN-biotina-neutravidina con el anticuerpo de detección. Para ello se realizaron ensayos donde se evaluaron ambas sondas (mono- y bi-biotiniladas) formando complejos autoensamblados con neutravidina (1:100), diluidas 1:2.000 en PBS y en PBS-BSA-T (Figura 48). Se realizaron ensayos de ELISA sandwich anti-hTSH en tubos de PCR de la misma manera que se hizo en el punto anterior. Se utilizó una concentración de antígeno 10 ng/ml. Se

empleó una solución control de neutravidina diluida en ambos búferes y en la mismas concentraciones de los complejos supramoleculares ADN-neutravidina analizadas (1:2.000; 1:10.000 y 1:100.000).

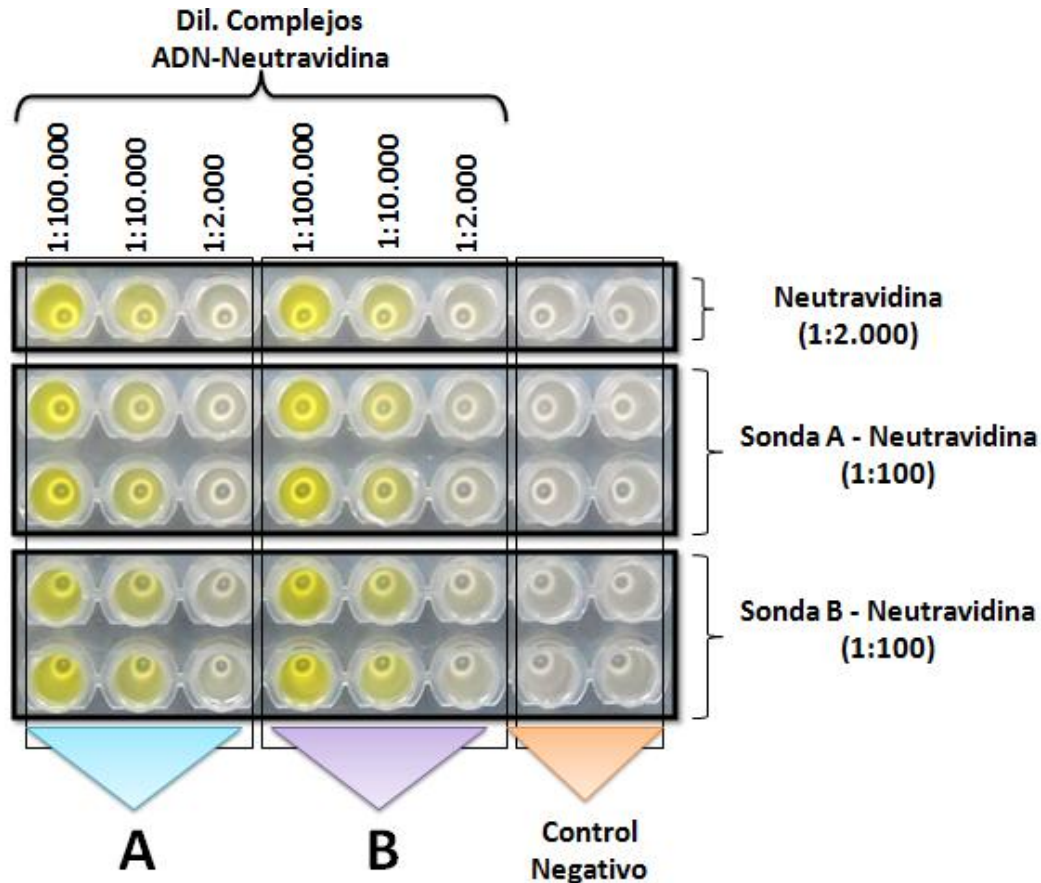


Figura 48: Evaluación del búfer de dilución complejos ADN-neutravidina con MAbs biotinilados. Vista superior del ensayo de ELISA sandwich realizado en tubos de PCR para el estudio de diluciones de los complejos autoensamblados de ADN mono- y bi-biotinilado con neutravidina. Se evaluaron dos búferes de dilución de los mismos: A: PBS-BSA-T y B: PBS. Como controles se utilizaron una solución de neutravidina sin ADN y el Control Negativo del inmunoensayo (sin antígeno).

En la Figura 48 se muestran los ensayos para evaluar la influencia de las diluciones de los complejos ADN-neutravidina en PBS y en PBS-BSA-T. Como se puede observar, y al igual que el punto anterior (Figura 47), la reacción colorimétrica es inhibida en su totalidad cuando la dilución de los complejos ADN-biotina y neutravidina es 1:2.000, para ambos búferes analizados. Para las diluciones de complejos 1:10.000 y 1:100.000 se observa un incremento de coloración en los pocillos. El control realizado con diluciones de neutravidina evidencia la misma reacción de inhibición de coloración que cuando forma parte de los complejos ADN-neutravidina. En su conjunto (Figura 47 y

Figura 48) estos ensayos nos brindaron información útil acerca de las relaciones y concentraciones mínimas necesarias entre los distintos componentes (ADN:neutravidina pre-esamblada 1:100, diluida 1:2.000) que van a formar parte del sistema IPCR.

4.7. Detección de hTSH por IPCR *sandwich*

Los ensayos preliminares para la puesta a punto del método se realizaron utilizando la hormona diluída en búfer PBS-L-T. Varios factores del protocolo de IPCR, tales como lavados, utilización de sondas mono- o bi-biotiniladas y formación de complejos pre-ensamblados de ADN-neutravidina y tiempos de incubación fueron ajustados empíricamente. Éstos están detallados en el Anexo. Una vez definidas las condiciones óptimas del ensayo, se determinó la máxima dilución del antígeno (hTSH en PBS-L-T) detectable.

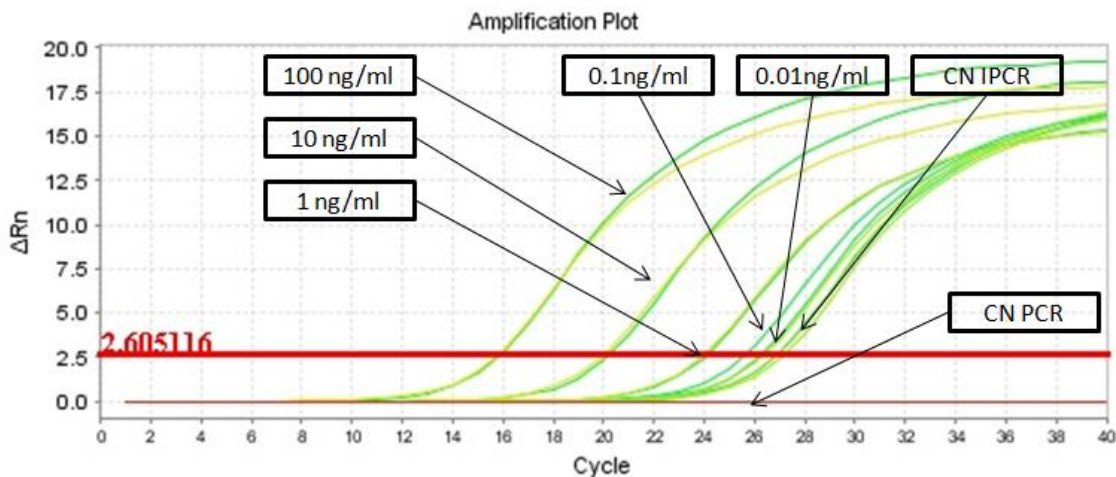


Figura 49: Detección de hTSH por IPCR *sandwich*. Se muestran las curvas correspondientes a las diluciones seriadas de hTSH (100 a 0,01 ng/ml) en PBS-L-T, al control negativo de IPCR (CN IPCR) y al control negativo de PCR (CN PCR). El NC IPCR no cruza el umbral hasta después de 27 ciclos. El LD se determinó como 10 pg / ml de hTSH en PBS-L-T.

En la Figura 49 se muestra el gráfico de detección (curvas de amplificación en tiempo real) de las diluciones de hTSH en PBS-L-T por IPCR *sandwich*. Durante la reacción de PCR, las lecturas de fluorescencia (señal reportera) de cada ciclo son normalizadas y graficadas en función del número de ciclo (eje de abscisas). Los valores de C_t se determinan por intersección del *threshold* (incremento lineal) y la curva de cada muestra. De los datos de C_t obtenidos a partir de la reacción de PCR en tiempo real se determinó la máxima dilución de antígeno detectable por IPCR *sandwich*. El LD del ensayo fue de 0,01 ng/ml (10 pg/ml), lo que significó un incremento en la capacidad de

detección 100 veces mayor que el ensayo de ELISA (1 ng/ml), evaluado en las mismas condiciones (búfer PBS-L-T) y utilizando los mismos anticuerpos (Capítulo IV; Figura 34). Este incremento en la capacidad de detección de la hormona nos permitió evidenciar la factibilidad de obtener un incremento en la resolución a bajas concentraciones de antígeno, en comparación con los ensayos de ELISA (B-4 y B-9) desarrollados previamente.

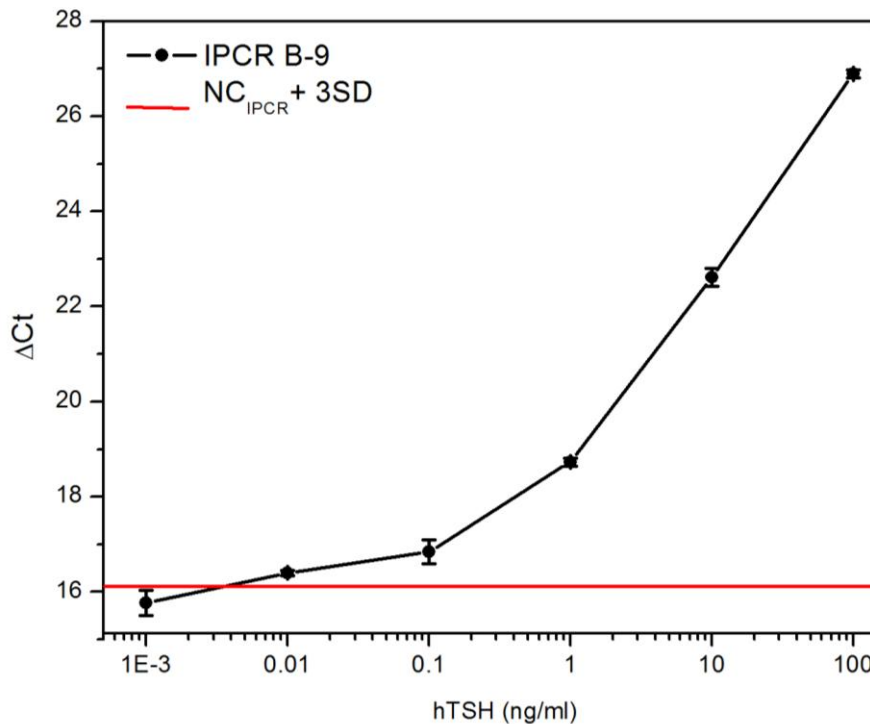


Figura 50: Detección de hTSH por IPCR. El delta Ct (ΔC_t) se representa en ordenadas y las concentraciones de antígeno ($1 \cdot 10^{-3}$ - 100 ng/ml) se representan en abscisas. $\Delta C_{t(NC)} + 3DS$ se refiere a la media del control negativo + 3DS, mostrada como una línea roja continua. Se consideran positivos todos aquellos valores de ΔC_t que superan al correspondiente valor promedio de ΔC_t del control negativo (CN IPCR) más tres DS. El LD del ensayo de IPCR es inferior a 0,01 ng/ml.

Luego de la reacción de PCR en tiempo real, el producto de reacción se evaluó por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 51 se muestran las imágenes donde se sembró la sonda de ADN, el complejo preformado de ADN-neutravidina utilizado para en la IPCR (1:100), un marcador de peso molecular y producto de la reacción de PCR de detección de tres muestras (10; 0,1; y 0,01 ng/ml). Esto permitió, en conjunto con la curva de desnaturalización, determinar la especificidad de la reacción de PCR, con un producto de amplificación de 181 pb.

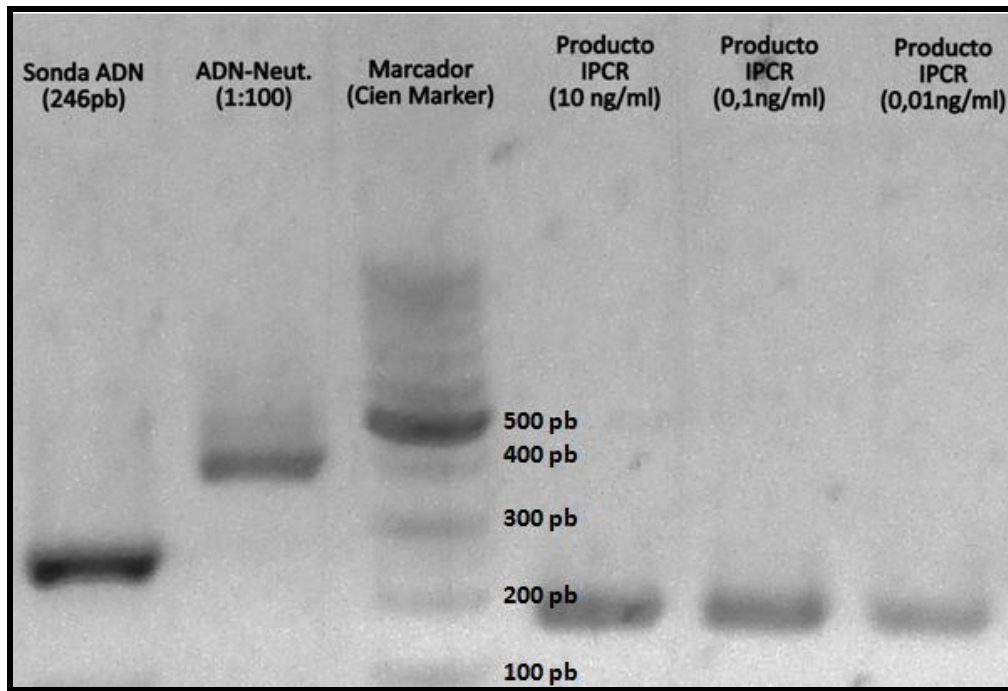


Figura 51: Análisis de los productos de PCR en ensayos de IPCR. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los producto de reacción de PCR de muestras seleccionadas al azar. El análisis se realizó en presencia de un marcador de peso molecular y de un control positivo. Esto permite, en conjunto con la curva de desnaturalización, determinar la especificidad de la reacción de PCR.

Antes de pasar a las pruebas con estándares de referencia y muestras de suero humano, nuestro siguiente paso fue probar la detección de la hormona diluida en PBS-L-T en concentraciones clínicamente relevantes. Debido a que la mayor limitación entre los métodos disponibles para la cuantificación de la hormona es cuando ésta se encuentra en bajos niveles, las concentraciones utilizadas fueron reducidas, comprendidas entre 0,5 – 2,5 ng/ml (0,1 y 5 μ UI/ml), tomando como referencia la curva estándar descrita en el Capítulo IV, punto 4.1., Figura 33. En la Figura 52 se muestran las curvas de amplificación obtenidas a partir de la cual se generó la curva de detección graficada en la Figura 53. Se puede observar que el ensayo de IPCR desarrollado para la detección de hTSH presentó un comportamiento lineal y resolución satisfactoria en el rango de concentraciones analizado, demostrando la factibilidad del uso de la IPCR para medir valores bajos de hTSH.

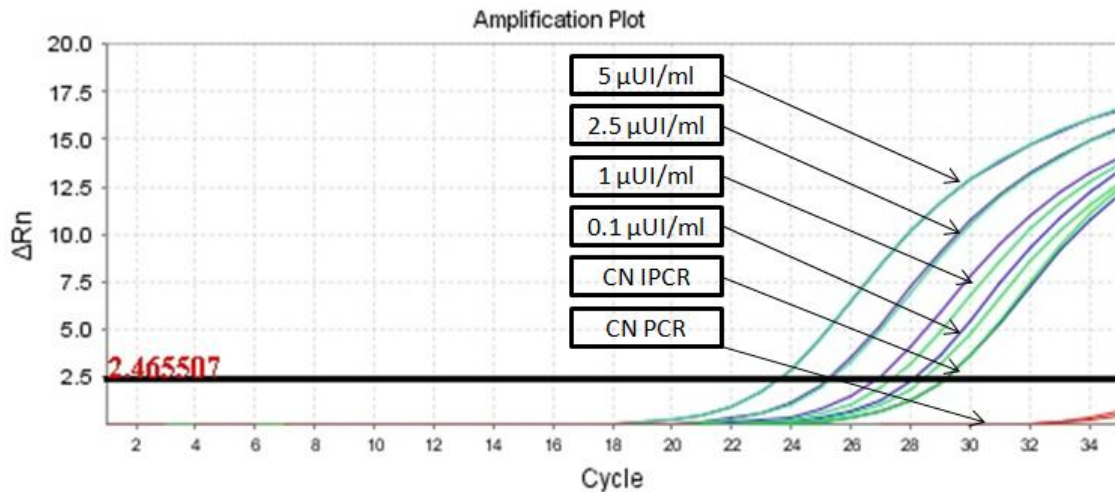


Figura 52: Curvas de amplificación en tiempo real obtenidas para la detección de hTSH por IPCR sandwich. Se muestran las curvas correspondientes a las diluciones seriadas de hTSH (5 a 0,1 $\mu\text{UI/ml}$) en PBS-L-T, al control negativo de IPCR (NC IPCR) y al control negativo de PCR (CN PCR). El NC IPCR no cruza el umbral hasta después de 27 ciclos.

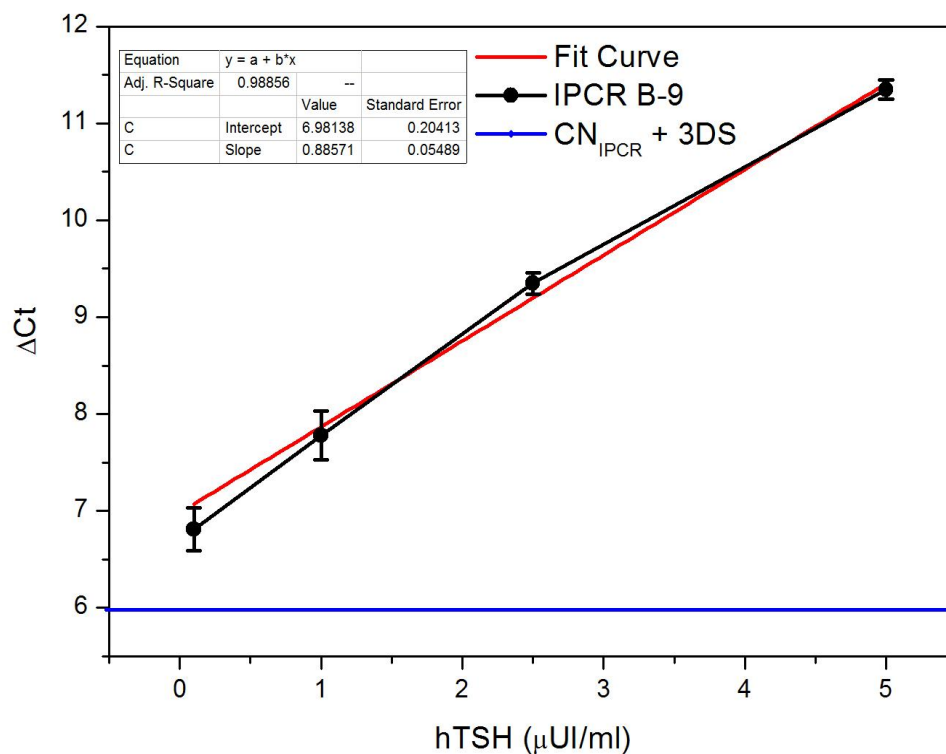


Figura 53: Curva de detección de hTSH por IPCR. El delta Ct (ΔCt) se representa en ordenadas y las concentraciones de antígeno (0,1 $\mu\text{UI/ml}$, 1 $\mu\text{UI/ml}$, 2,5 $\mu\text{UI/ml}$ y 5 $\mu\text{UI/ml}$) se representan en abscisas. ΔCt (CN) + 3DS se refiere a la media del control negativo + 3 DS, mostrada como una línea azul continua. Para cada una de las muestras se calculó: $Ct_{(p)}$ (Ct promedio), la DS y el ΔCt ($35 - Ct_{(p)}$). Los valores de Ct se determinan por intersección del threshold y la curva de cada muestra.

4.8. Evaluación del ensayo de IPCR *sandwich* frente a estándares comerciales

Comparamos la sensibilidad del ensayo de IPCR anti-hTSH, con el ELISA *sandwich* y con el kit comercial de ELISA del capítulo anterior, haciendo ensayos en paralelo con los calibradores estándar del kit comercial. En la Figura 54 se muestran las curvas de amplificación para hTSH por IPCR.

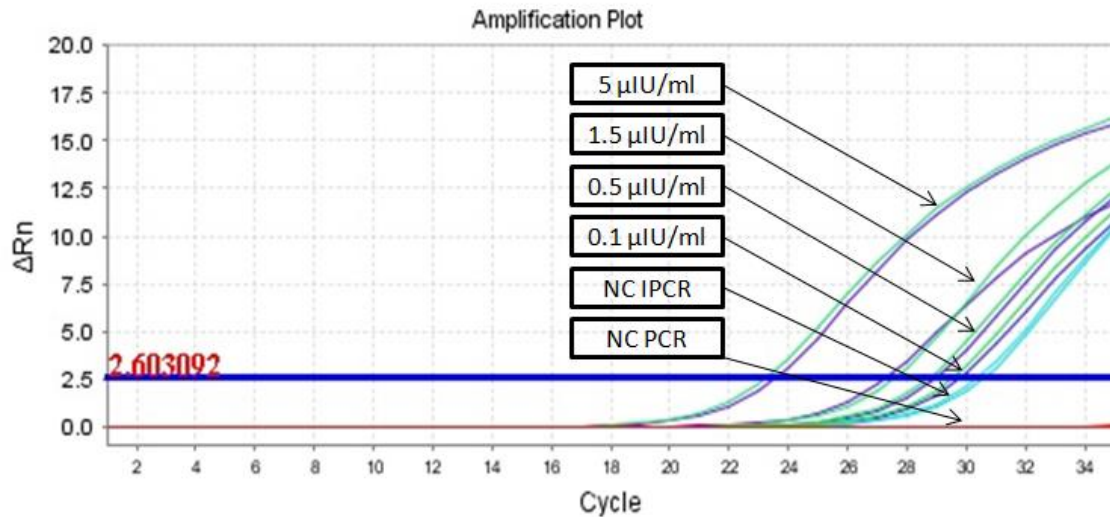


Figura 54: Curvas de amplificación en tiempo real obtenidas por IPCR *sandwich* frente a calibradores comerciales. Se muestran las curvas correspondientes a los calibradores de hTSH (5, 1.5, 0.5 y 0.1 $\mu\text{UI/ml}$), el control de negativo de IPCR (NC IPCR) y el control negativo de PCR (línea roja). El NC IPCR no cruza el umbral. De los datos de C_t obtenidos a partir de la reacción de PCR en tiempo real se graficó la curva de detección y se determinó la pendiente de la recta obtenida (sensibilidad). Para ello, para cada concentración de TSH se calculó: $C_{t(p)}$, la DS y el ΔC_t . Se consideran positivos todos aquellos valores de ΔC_t que superan al correspondiente valor promedio de ΔC_t del control negativo más tres DS.

En la Figura 55 se muestran las rectas de calibración obtenidas a partir de los datos de la figura 54 con los ensayos de IPCR (IPCR B-9) y de ELISA *sandwich* propios (ELISA B-9), en comparación con el Kit comercial (ELISA Kit Comercial). Se observa que la IPCR tiene una sensibilidad significativamente mayor que ambos ELISAs. El método de IPCR B-9 mostró mayor sensibilidad que los otros dos, evidenciado claramente por un mayor cambio en la respuesta frente al mismo cambio en la concentración del analito (mayor pendiente). Por esta razón, podemos afirmar que la técnica de IPCR demuestra una mayor sensibilidad en términos de definición de la sensibilidad como pendiente [125].

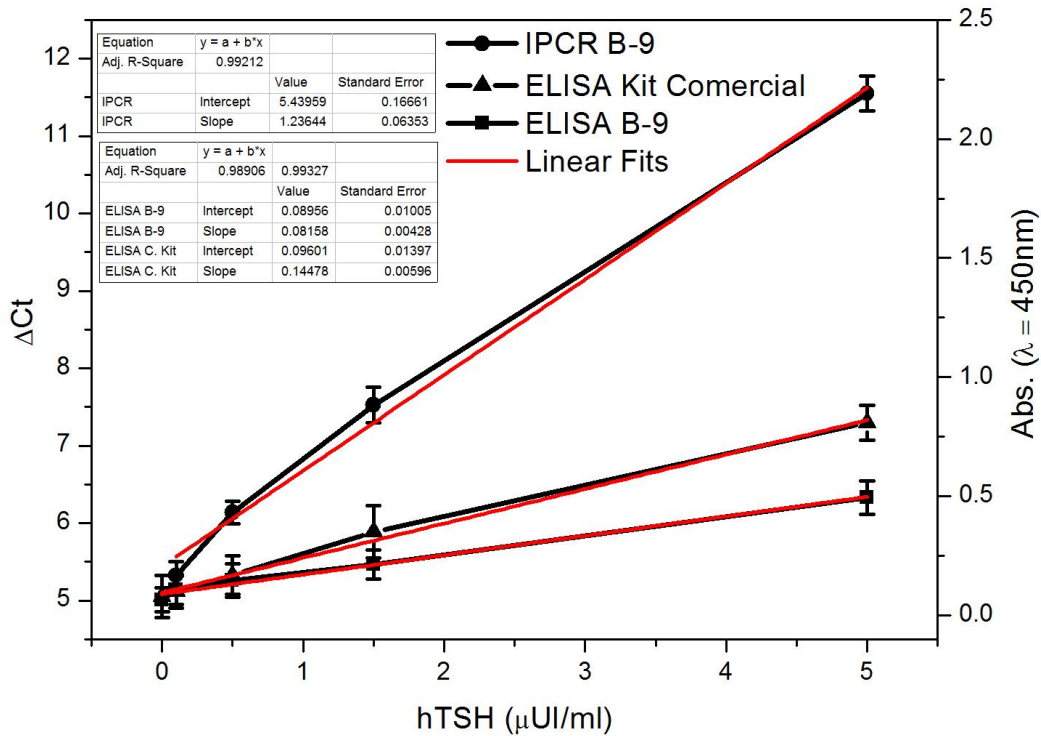


Figura 55: Curvas de detección de hTSH por IPCR y ELISA. Comparación de la sensibilidad del ensayo IPCR, ELISA en sandwich y el kit ELISA comercial en calibradores estándar. Los puntos de datos representan las intensidades de señal relativas para cantidades crecientes de antígeno. ΔCt IPCR se representa en la ordenada izquierda, la absorbancia medida a $\lambda = 450 \text{ nm}$ se representa en la ordenada derecha y las concentraciones de antígeno ($\mu\text{UI/ml}$) se representan en abscisas.

Por otro lado, se estableció el límite de cuantificación (LQ) del ensayo de IPCR (B-9). En la Figura 56 se grafica la recta de calibración a partir de la cual se estableció el mismo en $0,1 \mu\text{UI/ml}$.

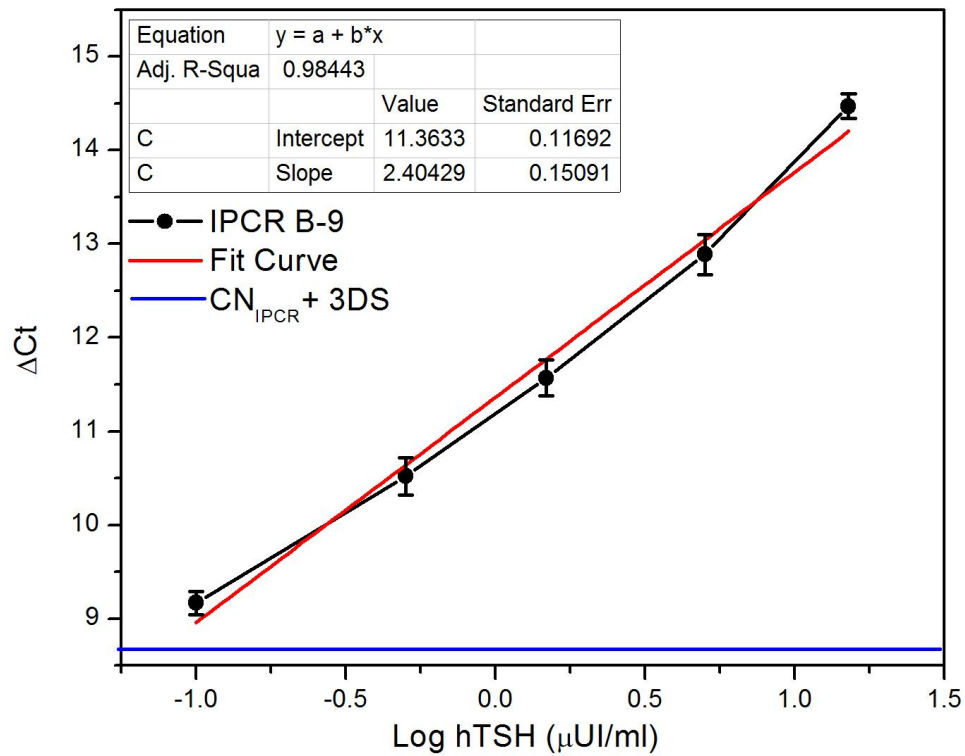


Figura 56: Curva de calibración por IPCR sandwich en estándares comerciales preparados según la 2° Preparación de Referencia Internacional de hTSH (IRP 80/558) de la OMS. El límite de cuantificación determinado es de $0,1 \mu\text{UI/ml}$.

4.9. Evaluación de la especificidad en muestras de suero humano

Para determinar la especificidad en suero, se realizaron ensayos de IPCR a *pooles* de suero, añadiendo hTSH, r-FSH, hLH o hCG (10 ng/ml) a muestras cuyo valor endógeno de TSH ($2,85 \mu\text{UI/ml}$) se midió previamente con un kit comercial (kit U-TSH EIAgen, Adaltis). Como podemos observar (Figura 57) la IPCR no muestra interferencias con otros componentes del suero humano y reconoce específicamente hTSH. Este estudio permitió complementar los estudios de especificidad de estos anticuerpos por ensayos de ELISA *sandwich* frente a todo el panel de HGP's relacionadas.

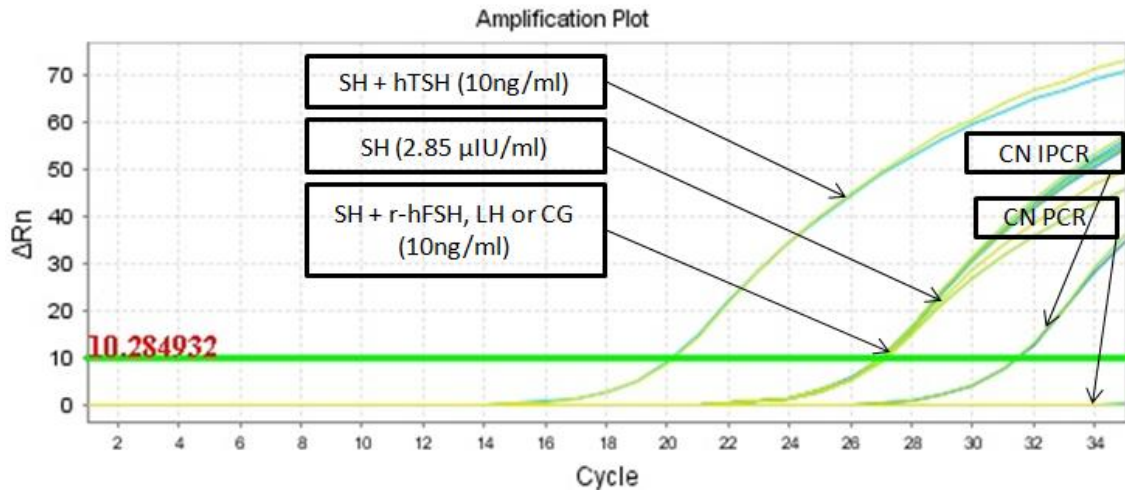


Figura 57: Curvas de amplificación en tiempo real obtenidas para la detección de hTSH por IPCR sandwich en suero humano. Hormonas glicoproteicas (hTSH, r-FSH, LH o CG) fueron diluidas (10 ng/ml) en pools de suero humano (SH); control negativo de IPCR (CN IPCR); control negativo de la reacción de PCR (CN PCR).

4.10. Parámetros funcionales de ensayo de IPCR (B-9)

En la Tabla 12 se describen los parámetros funcionales (LD, LQ, precisión y recuperación) obtenidos para el ensayo de IPCR sandwich con los anticuerpos denominados B-9.

Tabla 12: Parámetros funcionales del ensayo de IPCR sandwich anti-hTSH. Determinación de los parámetros funcionales del ensayo de IPCR (B-9) para la detección de hTSH en muestras de suero humano.

Características Funcionales	LD	Precisión (CV %)		Recuperación (%)
		Intra-ensayo	Inter-ensayo	
B-9	0,01 μ UI/ml	> 2,15	> 4,75	98,3 - 103

En el presente capítulo mostramos los resultados que avalan el desarrollo de un ensayo de IPCR de alta sensibilidad con capacidad de detectar concentraciones bajas de hTSH en muestras de suero humano, desarrollado en un formato de tipo “universal” y en tubos de PCR estándar sin necesidad de pretratamiento previo. Comparado con nuestro propio ELISA para hTSH (también realizado en la presente tesis) y con un kit comercial, nuestro ensayo hTSH-IPCR mostró una sensibilidad mayor en términos de pendiente (ver Capítulo VI). Ésto se traduce operativamente en una mejor resolución cuantitativa

en el rango de bajas concentraciones de TSH. Por lo tanto, consideramos que el método propuesto es una plataforma tecnológica potencialmente útil para la detección de bajas concentraciones de TSH en muestras de suero humano.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. Conclusión General

La TSH es una glicoproteína secretada por la hipófisis anterior [75]. Su función principal es estimular el desarrollo de la glándula tiroides y regular la secreción de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), que son las hormonas metabólicamente activas secretadas por esta glándula. El funcionamiento anormal de la tiroides es el resultado del aumento (hipertiroidismo) o de la disminución (hipotiroidismo) de la producción o excreción de las hormonas tiroideas [9]. Las patologías tiroideas son de las más frecuentes a nivel mundial [126,127]. Debido al exquisito control que ejercen las hormonas tiroideas periféricas sobre la secreción de TSH, la mayoría de los desórdenes de la tiroides pueden ser diagnosticados mediante la medición de los niveles de TSH y de hormonas tiroideas. Así, la determinación de TSH es utilizada como un análisis de primera línea en la evaluación del estado tiroideo, con el objetivo de asistir al proceso de decisión clínica del equipo de salud [128-131,101]. La mayoría de los métodos que se usan actualmente para medir TSH en los laboratorios clínicos son inmunoensayos heterogéneos de dos sitios o “*sandwich*” [101]. En virtud de su relevancia para el diagnóstico clínico, ha habido un creciente esfuerzo para desarrollar métodos analíticos con alta sensibilidad para medir TSH en fluidos biológicos humanos [131]. Sin embargo, aunque tanto la sensibilidad como la reproducibilidad de los inmunoensayos de TSH se han incrementado en los últimos 30 años, las diferencias en términos de performance analítica y valores medidos de TSH aún existen entre los métodos comercialmente disponibles [132]. Especialmente, sigue siendo elevada la variabilidad entre los métodos cuando las concentraciones de TSH son bajas (menores a 0,4 μ UI/ml), debido a la baja sensibilidad analítica de los inmunoensayos disponibles en este rango de concentración. Por lo tanto, podemos decir que el problema analítico relacionado con la evaluación del estado tiroideo es la baja sensibilidad de los inmunoensayos cuando los niveles de TSH en suero humano son bajos. Por otro lado, la técnica de IPCR es un recurso tecnológico de gran potencial que combina la versatilidad de las técnicas de ELISA con la gran sensibilidad del análisis de ácidos nucleicos por PCR. Numerosos ejemplos de la literatura evidencian una mejora de entre 10 y 10.000 veces en la sensibilidad cuando distintos protocolos de ELISA son adaptados a un ensayo de IPCR. Teniendo en cuenta lo mencionado, en el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar y desarrollar sistemas diagnósticos de TSH basados en un ensayo inmunométrico tipo ELISA *sandwich* e IPCR *sandwich*. Entre éstos, nuestro principal

objetivo fue el desarrollo de un protocolo de IPCR universal rápido, robusto y sensible para la determinación de bajos niveles de TSH en suero humano.

Podemos clasificar las innovaciones logradas durante el desarrollo de la tesis en dos tipos: de medición analítica tiroidea y de aspectos técnicos de la metodología de IPCR.

a) Innovación en la medición analítica tiroidea

En las últimas décadas, se ha dado una discusión en el campo de la química analítica debido a la coexistencia de dos definiciones de sensibilidad. La definición formal de sensibilidad interpreta el término como el cambio en la respuesta de un sistema para un pequeño cambio del estímulo que causa la respuesta. En concordancia con esta definición, se asocia la sensibilidad analítica de un método dado con la pendiente de una gráfica de calibración frente a estímulo. Una interpretación alternativa define la sensibilidad como el valor más pequeño del estímulo que se puede resolver con un determinado grado de confianza, es decir, el límite de detección. El uso en química analítica de la primera definición data por lo menos del comienzo de este siglo, mientras que las aplicaciones de la segunda interpretación son de origen más reciente. Cada una de estas definiciones ha tenido defensores y detractores, dando lugar a un rico debate científico [125,133,134].

Nuestra opinión es que la interpretación de sensibilidad en términos de pendiente es un descriptor más adecuado del rendimiento analítico de un sistema de medición. En primer lugar, esta interpretación es consistente con las definiciones formales del término. De hecho, consideramos que las interpretaciones de sensibilidad como imprecisión [133] o como límite de detección [134] son inconsistentes con las definiciones formales. Además, ya existe una terminología específica para definir la imprecisión analítica (desviación estándar) y las cantidades detectables más pequeñas (límites de detección), por lo que el término sensibilidad es necesario en su sentido formal estrictamente definido. En segundo lugar, existe una precedencia histórica para la definición de la pendiente, que se puede rastrear fácilmente al menos hasta el comienzo de este siglo (Treadwell FP, Hall WT. Analytical chemistry, Vol. 2, 1912: 7-8 Wiley New York, citado en [125]). Finalmente, la definición de pendiente proporciona mucha más información acerca de un método analítico que la definición de "imprecisión" propuesta por Ekins y Edwards [133] o la definición relacionada de "límite de detección" [134], ya que describe el comportamiento del método analítico a

lo largo de todo el rango de concentraciones para el cual fue diseñado. Este último aspecto fue evidente para nosotros cuando comparamos el rendimiento analítico de la IPCR con los dos ELISAs de TSH utilizados en esta tesis. Cuando se analizan las Figuras 55 y 56, se puede observar que mediante el método de IPCR conseguimos un incremento considerable de la sensibilidad y un importante aumento de la capacidad de detección (LD), que paso de 0,1 $\mu\text{UI/ml}$ a 0,01 $\mu\text{UI/ml}$ respectivamente. El incremento de sensibilidad obtenido se visualiza fácilmente al comparar la pendiente de la curva de calibrado de IPCR con la de los ELISAs, tanto el propio como el comercial).

b) Aspectos técnicos de la metodología de IPCR

Durante este trabajo de tesis fue necesario abordar muchísimos aspectos técnicos inherentes a la metodología de IPCR. Todos ellos fueron descritos en detalle en los capítulos precedentes y en el Anexo, pero aquí quisiéramos destacar los siguientes como los más innovadores desde el punto de vista estrictamente metodológico:

- uso de un esquema de incubación de 1 etapa (muestra y MAb de detección)
- utilización de los complejos pre-ensamblados ADN-neutravidina (simultáneo)
- pretratamiento de los tubos estándar de PCR

Otros factores importantes que generan elevadas señales de fondo o *background*, son los lavados deficientes y la estrategia de bloqueo. Al haber adoptado un protocolo estricto en el número de lavados y determinado las condiciones óptimas de ensayo, pudimos obtener niveles bajos de señal de fondo o *background* de manera reproducible.

Pensamos que un elemento clave que condiciona de manera directa los ensayos realizados, es la utilización de tubos de PCR de polipropileno. A diferencia de los materiales utilizados para inmunoensayos como ELISA, estas superficies no se encuentran acondicionadas para la adsorción pasiva de biomoléculas, como es el caso de las placas de poliestireno. En general, este inconveniente se resuelve disponiendo, de microplacas compatibles con el modelo de termociclador para los ensayos de IPCR con detección en tiempo real. Aunque la disponibilidad de estos instrumentos está aumentando rápidamente en los laboratorios, actualmente es un recurso que no está disponible en el contexto local.

Por otro lado, y como es el caso para cualquier ensayo inmunológico que está en etapa de investigación y desarrollo, el éxito de cualquier sistema de IPCR estará limitado por la “calidad” (afinidad y especificidad) de los anticuerpos implicados. Por esta razón, es muy útil disponer de un panel amplio de anticuerpos monoclonales debidamente caracterizado, que permitan ensayar distintas estrategias.

También es importante resaltar que los protocolos aquí desarrollados pueden ser adaptados de forma relativamente simple a numerosas aplicaciones por simple intercambio del sistema de detección. Al haber elegido un formato de IPCR de tipo “universal”, las sondas de ADN y los complejos preformados son aplicables a cualquier inmunoensayo que ya esté funcionando. El desarrollo de un modelo de IPCR que pueda ser fácilmente adaptable a cualquier inmunoensayo tipo ELISA permite convertir una técnica convencional en un método alternativo con capacidad de detección ultrasensible. Desde el punto de vista práctico, la ejecución de un ensayo de IPCR no requiere ninguna instrumentación sofisticada, ya que puede llevarse a cabo utilizando equipos de laboratorio para el manejo de inmunotécnicas habituales y de PCR. El aumento de sensibilidad que se logra podría abrir nuevas rutas en el diagnóstico de moléculas de interés que normalmente no pueden ser estudiadas por ensayos tradicionales. Su potencia analítica se debe a la combinación de la flexibilidad y solidez metodológica basada en la interacción antígeno-anticuerpo con la capacidad de amplificación exponencial de la PCR. Esta metodología ha sido aplicada en otros campos alejados de la clínica, para la determinación de sustancias que sólo podían ser detectadas por técnicas costosas y de difícil acceso desde el punto de vista comercial. Por ejemplo, la determinación de contaminantes ambientales (hidrocarburos aromáticos policíclicos), toxinas presentes en alimentos y desechos agroindustriales, todos de altísimo impacto en salud pública, y que sólo podían ser realizados por GC, HPLC o por métodos basados MS.

ANEXO

- 1. Evaluación de los antígenos nativos provistos por el NIDDK*
 - 2. Obtención de antígenos recombinantes*
 - 3. Obtención de MAbs por fusiones en medio semisólido*
 - 4. Evaluación de otros formatos de ELISA sandwich*
 - 5. Optimización de los ensayos de IPCR*
-

1. Evaluación de los antígenos nativos provistos por el NIDDK

1.1. Introducción

El objetivo de este trabajo de tesis consistió en el desarrollo de sistemas diagnósticos para TSH basados en ensayos tipo ELISA e IPCR *sandwich*, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales. Por esta razón, la obtención y selección de MAbs aptos para la detección específica de la hormona en muestras de suero humano fue, desde el comienzo, un aspecto central. Inicialmente, para la producción y selección de anticuerpos (inmunizaciones, fusiones, *screenings*, caracterización, etc.) y posterior optimización de los inmunoensayos de ELISA e IPCR, dispusimos de los antígenos nativos provistos por el NIDDK: las hormonas hipofisarias (hTSH, hFSH, hLH) y la hormona placentaria (hCG), todas purificadas a partir de muestras humanas cadavéricas. Como se describió en el Capítulo III, para la producción de MAbs se utilizó la tecnología de hibridomas a partir de ratones BALB/c expuestos a diferentes protocolos de inmunización con hTSH. En cada ensayo de fusión, las líneas de hibridomas que presentaron características favorables de reactividad, proliferación y desarrollo fueron seleccionadas para el aislamiento de clones de interés. Este procedimiento se llevó a cabo por el método de dilución límite y posterior *screenings* de clones específicos por ELISA indirecto anti-hTSH. Aquellos clones que en primera instancia mostraban reacción positiva contra hTSH por ELISA específico indirecto, eran expandidos gradualmente y reevaluados frente a todo el panel de glicohormonas nativas (hTSH, hFSH, hLH y hCG). De esta manera, durante los primeros ensayos, se evaluó la especificidad de los clones. En este contexto nos encontramos con la dificultad de que no lográbamos identificar u obtener MAbs que reconocieran única y específicamente hTSH. Todos los clones seleccionados luego del proceso de aislamiento por dilución límite mostraban reacción cruzada con al menos una hormona, fundamentalmente hFSH. Como se muestra en la Figura 58, los MAbs evaluados se distribuían sólo en dos grupos: los que reconocían a las cuatro hormonas con reactividad similar (MAbs α) y los que se unían con elevada reactividad tanto a hTSH como a hFSH, y en menor medida al resto de las hormonas (MAbs $\beta_{(a)}$). En este punto no éramos capaces de obtener o identificar MAbs contra epítopes específicos de la subunidad β de hTSH. Con el objetivo de sortear este problema encaramos dos estrategias en simultáneo: producir la subunidad β de TSH recombinante y evaluar “la calidad” de los antígenos provistos por NIDDK con un kit de ELISA comercial específico para TSH humana. Por otro lado,

incorporamos al panel de antígenos la hormona folículo estimulante recombinante (r-hFSH), producida en células CHO y destinada para su uso en bioterapia. Esta última, al ser un producto recombinante, purificado con el fin de ser utilizado en humanos, la posibilidad de estar contaminada con alguna otra hormona perteneciente a la familia de las HGP's humanas es muy poco probable. Consideramos que este ensayo podría orientarnos con respecto a la pureza de los antígenos utilizados ya que los mismos fueron obtenidos directamente de tejidos humanos, con un riesgo considerable de que no se encuentren puros o que no sean apropiados para la evaluación de especificidad de los clones aislados.

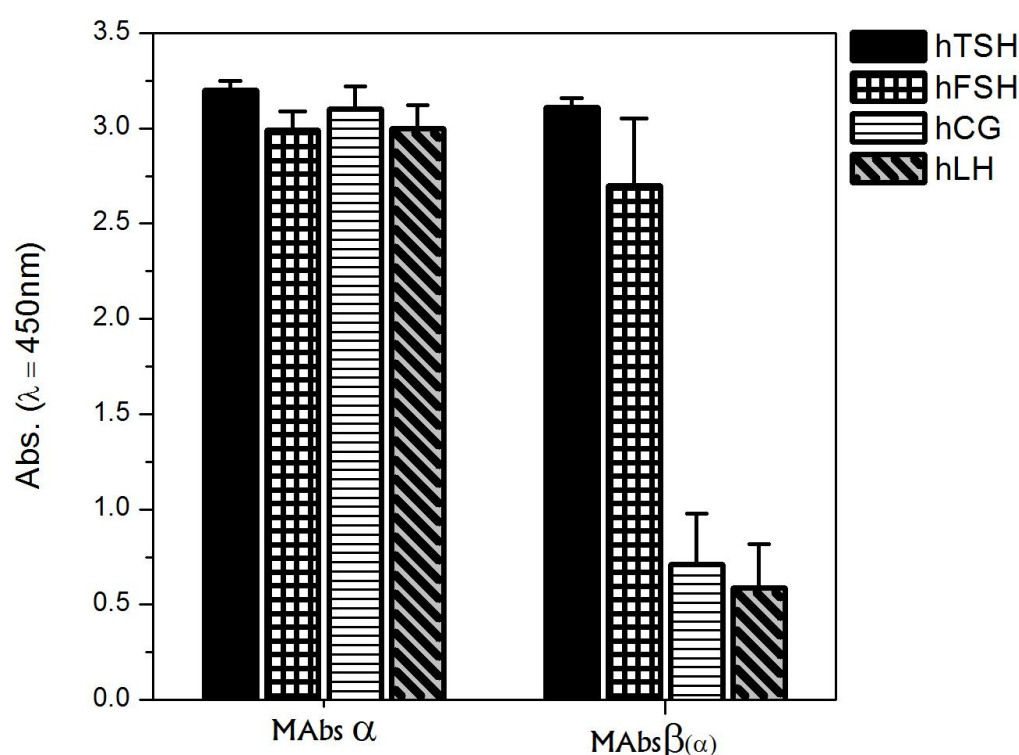


Figura 58: Clasificación de MAbs anti-hTSH. Clasificación de MAbs obtenidos por dilución límite a partir las distintas líneas anti-hTSH seleccionadas. La clasificación se realizó a partir de inmunoensayos frente a la familia de hormonas glicoproteicas: hTSH; hFSH; hCG y hLH.

1.2. Materiales y Métodos

Utilizando el kit de ELISA comercial TSH IEMA WELL (KT3IW; Radim), se evaluaron las hormonas nativas hTSH, hFSH, hLH y hCG provistas por NIDDK, y la hormona recombinante r-hFSH (Zelltek S.A.; Lot. 110623). Según el fabricante, este kit de TSH tiene un 0,01% de reacción cruzada con hCG, hLH y hFSH. Todos los antígenos se llevaron a una concentración final de 100 ng/ml en PBS-BSA-T. El procedimiento se

llevó a cabo siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante y el tiempo de revelado fue de 5 minutos. Controles negativos se realizaron con el búfer de dilución de las hormonas. La lectura de la reacción de color se efectuó a $\lambda = 450$ nm, en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).

1.3. Resultados y Discusión

Como se muestra en la Figura 59, el kit de ELISA para TSH mostró considerable reacción cruzada con hFSH, presentando casi un 65% de la absorbancia de la obtenida para hTSH. En menor magnitud hLH también presentó reacción (9% en relación a la obtenida con hTSH). hCG, r-hFSH y el control negativo no presentaron reacción cruzada. Pensamos que esto se deba a la presencia de hTSH en los extractos purificados de hFSH y hLH. Esta impureza de los antígenos probablemente se deba a que las tres hormonas se obtuvieron de hipófisis cadavéricas.

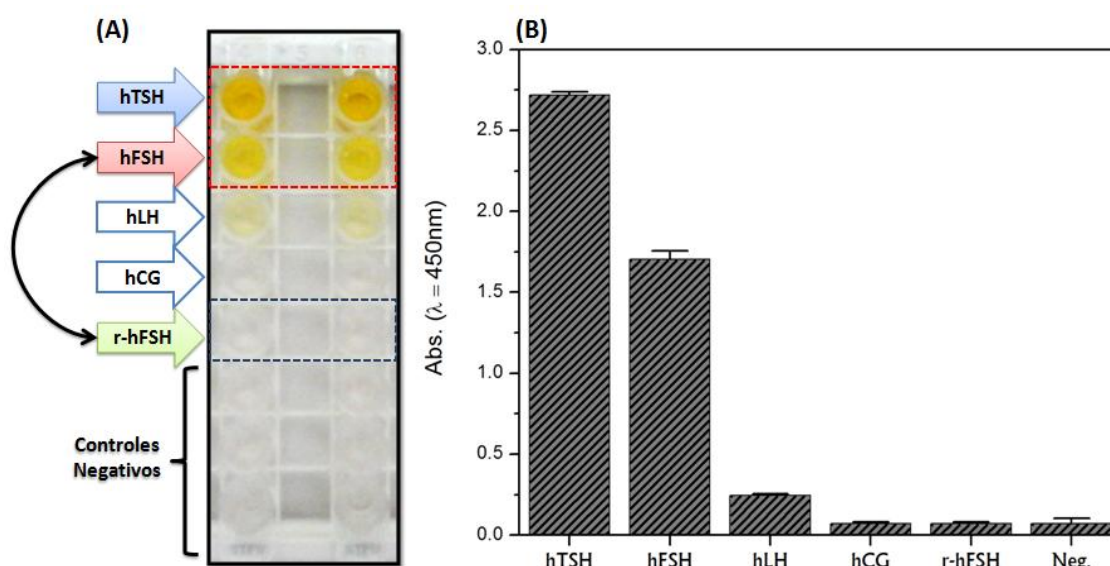


Figura 59: Evaluación de los antígenos hormonales NIDDK (hTSH, hFSH, hLH y hCG) y de la hormona recombinante r-hFSH utilizando el kit comercial TSH IEMA WELL. (A): fotografía de la evaluación de la pureza de los antígenos por el kit de ELISA comercial. (B): valores absorbancias obtenidos se ($\lambda = 450$ nm) (eje de ordenadas) y para cada uno de las hormonas evaluadas (eje de abscisas).

Basándonos en este resultado, consideramos a hFSH como no apto para evaluar la especificidad de los clones producidos. Decidimos utilizar r-hFSH en reemplazo de la hormona nativa hFSH, tanto para la producción y selección de anticuerpos (inmunizaciones, fusiones, *screenings*, caracterización, etc.) como para la posterior optimización de los inmunoensayos de ELISA e IPCR.

2. Obtención de antígenos recombinantes

2.1. Introducción

Teniendo en cuenta que los clones aislados mostraban reacción cruzada con al menos una hormona (ver punto 1 de este Anexo), nos propusimos obtener el antígeno recombinante como alternativa del nativo para la obtención de MAbs específicos de la subunidad β de TSH. Además, contábamos con cantidades limitadas de la hormona nativa de hTSH y consideramos crítico disponer de una alternativa en caso de agotamiento de la misma. Las masas de antígeno nativo (hTSH) utilizado en distintas etapas del trabajo (inmunizaciones de ratones, *screenings* de clones, evaluación y selección de MAbs, optimización de inmunoensayos) eran considerablemente superiores al resto de los antígenos disponibles (r-hFSH, hLH y hCG), que sólo se utilizaban en ensayos de evaluación de la especificidad.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Expresión de polipéptidos derivados de la subunidad beta de TSH en cultivos de células procariotas

Se seleccionaron 2 polipéptidos, uno correspondiente al exón 2 completo (TSHe2) y el otro al exón 3 completo (TSHe3) del gen de la cadena β de TSH humana. Ambas secuencias se obtuvieron por amplificación por PCR a partir de ADN genómico humano.

Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como productos de fusión con la proteína glutatión S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* se utilizó el plásmido pGEX-4T-3 (GE, Healthcare). Esta fusión favorece la solubilidad de las proteínas recombinantes, aumenta la inmunogenicidad y permite su posterior purificación por cromatografía de afinidad empleando columnas de glutatión-agarosa. Para la obtención de ADN plasmídico (pGEX-4T-3) se partió de un medio saturado de células *E. coli* DH5 α que contenían el vector, cultivadas 12 horas en 3 ml de medio LB suplementado con ampicilina (Sigma-Aldrich). La preparación de ADN plasmídico se realizó empleando el kit comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, Biodynamics) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, los productos de PCR fueron ligados al vector de expresión pGEX-4T-3 en el sitio de múltiple clonado. Para ello los *primers* de la PCR se construyeron agregando nucleótidos para poder insertar en los sitios XhoI y EcoRI cada uno de los fragmentos obtenidos. Una vez obtenidos, purificados y cortados, los fragmentos se ligaron al

vector utilizando T4 ADN ligasa de origen bacteriofágico. Los clones recombinantes obtenidos fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli DH5α* con el objetivo de obtener los correspondientes stocks [113,135].

2.2.2. Preparación de células competentes

Para la preparación de bacterias competentes se realizó una siembra por estría de células *E. coli JM109* o *E. coli DH5α*, obtenidas de un stock conservado a -70 °C, sobre una placa de LB-agar. Se cultivaron durante toda la noche a 37 °C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inocularon en 3 ml de medio LB, incubándose a 37 °C durante toda la noche con agitación a 200 rpm. Cada cultivo se repicó en una dilución 1:100 en 50 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación durante aproximadamente 3 horas, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de aproximadamente 0,5 ($\lambda = 550$ nm). Posteriormente, las células fueron trasvasadas aseptícamente a un tubo de centrifuga estéril enfriado previamente e incubadas durante 15 minutos en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4.000 rpm (Eppendorf 5810 R) durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 20 ml de solución de transformación I fría [KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15% V/V, pH = 5,8, esterilizada por filtración a través de una malla de 0,22 μ m]. Se incubó durante 10 minutos en baño de hielo y luego se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 2 ml de solución de transformación II [MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15% V/V, pH = 6,5, esterilizada mediante filtros de 0,22 μ m], incubándose nuevamente durante 15 minutos en hielo. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 100 μ l en criotubos y conservada a -70 °C hasta su utilización.

2.2.3. Transformación de bacterias

La transformación de bacterias (*E. coli JM109* o *E. coli DH5α*) se llevó a cabo descongelando 100 μ l de células competentes, adicionándoles 10 μ l del producto de ligación, e incubando durante 30 minutos en baño de hielo. Posteriormente, la mezcla se incubó durante 1 minuto en baño a 42 °C y, por último, durante 2 minutos en baño de hielo. Se adicionó 900 μ l de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 minutos, se descartaron 850 μ l de sobrenadante y el paquete celular se distribuyó uniformemente en placas

conteniendo LB-agar con el antibiótico correspondiente, de modo tal de seleccionar las bacterias transformadas. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

Se críopreservaron 10 clones de cada fragmento insertados en el vector pGEX-4T-3 en células *E. coli DH5alpha*. Cada uno de esos stocks fue testeado por PCR para reconocer la presencia del inserto correspondiente. Se eligieron 2 clones positivos, uno de cada exón, y se utilizaron para transformar células de *E. coli JM109*. Las bacterias transformadas fueron repicadas en botellas para hacer ensayos de expresión de las proteínas de fusión GST-TSHe2 y GST-TSHe3. Alícuotas de los sobrenadantes de sonicados se estudiaron por SDS-PAGE y se observaron las bandas correspondientes a las proteínas recombinantes, reconocidas por su abundancia relativa y su peso molecular. El resto del sobrenadante fue destinado para purificación mediante cromatografía de afinidad en una columna de glutatión.

2.2.4. Purificación de los polipéptidos recombinantes fusionados a GST

Un cultivo saturado de células con los clones de interés se repicaron en una proporción de 1:20 en un volumen final de 400 ml de LB con ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer 2 - 3 horas a 37 °C con agitación continua a 180 rpm (Orbital Shakers; Thermo-Forma). Una vez que se alcanzó una DO de 0,8 aproximadamente, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes mediante el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. El cultivo se incubó durante tres horas a 37 °C con agitación. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación a 5.000g y se lavaron con solución de PBS, pH = 7,5. Después de centrifugar, el sedimento celular fue resuspendido en 20 ml de PBS con el agregado del inhibidor de proteasas a una concentración final de 1 mM. El cultivo de células fue sonificado en baño de hielo (*High Intensity Ultrasonic Processor*, Vibra-Cell, Sonics and Materials Inc.) y centrifugado a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. En cada caso el sobrenadante fue recuperado y las proteínas de fusión fueron purificadas utilizando columnas cromatográficas GSTrap™ (GE, Healthcare). La absorbancia a $\lambda = 280$ nm fue registrada en espectrofotómetro y aquellas fracciones conteniendo la proteínas fueron homogeneizadas. La purificación fue chequeada en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

2.2.5. SDS-PAGE

La separación de las proteínas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), se realizó preparando geles

discontinuos de concentración variable de poliacrilamida (BioRad Laboratories) entre 5-12% en el gel de resolución. El gel de separación se preparó en solución Tris-HCl 375 mM, pH = 8,8; SDS 0,1% P/V, con una concentración de acrilamida final de 12-15% P/V. El gel de concentración se preparó con acrilamida al 4,5% P/V en solución Tris-HCl 125 mM pH = 6,8; SDS 0,1% P/V. La separación electroforética fue llevada a cabo en solución Laemmli (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% P/V, pH = 8,3) aplicando un voltaje constante de 10 V/cm de gel. Las muestras se desnaturalizaron por incubación durante 3 min a 100°C y se sembraron en solución de siembra de proteínas (Tris-HCl 10 mM, pH = 7,0; EDTA 2 mM, pH = 8,0; SDS 2% P/V; β -mercaptoetanol 0,5% P/V; azul de bromofenol 0,5 mg/ml). Una vez terminada la corrida electroforética los geles fueron sumergidos en solución colorante de proteínas [Coomassie Brilliant Blue R-250 1% P/V, en una mezcla de etanol- ácido acético - agua, 50:10:40] durante 30 minutos a 37°C. Luego se recuperó el excedente de solución colorante, se realizaron cinco lavados con agua destilada y se sumergió el gel teñido en solución decolorante de geles de proteínas (etanol - ácido acético - agua, 25:10:65) hasta que se eliminó el exceso de colorante.

2.2.6. Inmunización de ratones con polipéptidos recombinantes

Se inocularon ratones BALB/c machos, de 2 meses de edad, por vía IP con 20 μ g de GST-TSHe2 y GST-TSHe3 en 100 μ l de PBS (pH = 7,5) y emulsionado con igual volumen de adyuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich). El tratamiento se repitió cada 7 días durante 3 semanas empleando, en esta oportunidad, adyuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich). Transcurrida una semana de la última inyección, se extrajo sangre para verificar la presencia de anticuerpos anti-GST-TSHe2 y anti-GST-TSHe3 por técnica de ELISA específico indirecto frente a GST-TSHe2 o GST-TSHe3 y frente a hTSH nativa.

2.2.7. Expresión de la subunidad beta de TSH (TSH $_{\beta}$) en cultivos de células eucariotas

Por los resultados obtenidos (ver mas adelante), decidimos iniciar la producción de antígenos recombinantes en líneas celulares eucariotas. Para esto debimos instruirnos en metodologías relacionadas a la transferencia de material genético en sistemas eucariotas e incorporar metodologías que no habían sido abordadas hasta este momento en nuestro instituto. Con el fin de emprender este desafío se realizó una estadía en la Unidad de Biología Celular del *Institut Pasteur de Montevideo* (UBC – IPMon) bajo la dirección

de la Dra. Bollatti-Fogolín, durante la cual se llevaron a cabo entrenamientos en técnicas vinculadas al cultivo de células animales. Se incorporaron metodologías asociadas a la transferencia de material genético en células eucariotas, se realizaron cultivos pilotos y se evaluaron distintos métodos para la transfección (transiente y estable) mediada por lípidos catiónicos de cultivos adherentes. Luego, para la producción de antígenos recombinantes en nuestro laboratorio, incorporamos al banco de células las líneas de células animales CHO_K1 y HEK_293. Para cada una de estas líneas, generamos un banco maestro y banco de trabajo, complementado con sus correspondientes evaluaciones de esterilidad, micoplasma y viabilidad. Por otro lado, se adquirió el plásmido pAV2hTSHbeta (ATCC) que contiene la secuencia para la expresión de la subunidad β de la hormona TSH humana (TSH $_{\beta}$).

Con el fin de obtener antígenos recombinantes aptos para la producción de MAb's específicos, nos propusimos la obtención de la subunidad β de la hormona hTSH (TSH $_{\beta}$) a partir del vector plasmídico pAV2hTSHbeta (ATCC) y por medio de ensayos de transfección transientes de las líneas celulares animales en cultivos adherentes.

2.2.8. Transfección de células CHO_K1 y HEK_293

Una vez incorporadas las líneas CHO_K1 y HEK_293 a nuestro laboratorio, el primer paso fue verificar la transfectabilidad de las mismas utilizando el lípido catiónico polietilenimina (PEI) y determinar las condiciones óptimas de transfección para cada una de las líneas disponibles. Para ésto se realizaron diversos ensayos pilotos de transfección transientes con el vector de expresión pEGFP_C3 (BD Biosciences Clontech), que expresa la proteína verde fluorescente (GFP).

El protocolo general utilizado para todos los ensayos de transfección en las líneas celulares CHO_K1 y HEK_293 fue el siguiente:

- **Preparación de PEI:** Se pesan 100 mg de PEI y se disuelven en 100 ml de H₂O_{dd}. La solución se lleva a pH = 7 con HCl y posteriormente se esteriliza con filtro de tamaño de poro de 0,22 μ m. La solución estéril se alícuota en tubos *epENDORF* por 100 y 500 μ l y se almacena a -80 °C hasta su utilización.
- **Día 1:** Se realiza el desprendimiento enzimático con tripsina (Gibco) de células *wild type* de un cultivo en fase de crecimiento exponencial [medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: 4,5 g/l de D-Glucosa L-Glutamina; 110 mg/l

de Piruvato de Sodio 0,11 g/l; Gibco) suplementado con 5% de SFB]. Las células se resuspenden en un volumen final de 5 ml y se toma una alícuota para recuento celular. La suspensión se diluye de manera tal de obtener una concentración de 200.000 células/ml. En una placa de 24 pozos (Greiner Bio-One) se coloca 1 ml/pocillo de esta suspensión. En cada caso se consideran pozos para el control negativo.

– **Día 2:**

- 1) SOLUCIÓN A: se prepara a partir de 99% de medio basal (D-MEM, Gibco) + 1% de PEI 1 mg/ml (*branched*, 25.000 kDa, Sigma-Aldrich). Se mezcla suavemente y se deja reposar 5 minutos a TA.
- 2) SOLUCIÓN B: se prepara a partir de 90% de medio basal (D-MEM, Gibco) + 10% de ADN plasmídico (producto purificado) de manera tal de que se coloquen 0,5 – 1 µg ADN, en un volumen final de 100 µl/pocillo. Se mezcla suavemente y se deja reposar 5 minutos a TA.
- 3) Se mezclan y homogenizan las dos soluciones (A y B) y se incuban a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para el control negativo, se utiliza por separado la solución de PEI con medio basal y la solución de ADN con medio basal respectivamente.
- 4) Se descarta el sobrenadante de las células *wild type* a transfectar. Se lava con 1 ml de medio de cultivo basal para eliminar los restos de SFB que inhiben la transfección. Se incuban con 1 ml de dicho medio hasta el momento de la transfección.
- 5) Se descarta el sobrenadante de las células a transfectar.
- 6) A cada pozo se le agrega 200 µl de la mezcla lípido-plásmido correspondiente y se incubó durante 4 horas en estufa gaseada con CO₂ a 37 °C.
- 7) Finalmente, a cada pozo se le agrega 800 µl de medio basal (D-MEM, Gibco) suplementado con 5% de SFB.
- 8) La eficiencia de transfección se evaluó luego de las 24 y 48 horas por microscopía de fluorescencia.

2.2.9. Expresión de TSH β en células CHO_K1 y HEK_293

Luego de evaluadas las líneas celulares y optimizadas las condiciones de transfección, se realizaron ensayos para la obtención recombinante de la subunidad β de TSH (TSH β) y posterior evaluación de los sobrenadantes de cultivo por ELISA *sandwich*. Para ello se realizaron ensayos de transfección transiente en ambas líneas celulares (CHO_K1 y HEK_293) utilizando el lípido catiónico PEI y el vector que contiene la secuencia que codifica la subunidad β de la hormona hTSH (pAV2hTSHbeta; ATCC). Este vector, denominado pAV2, deriva del plásmido pBR322, posee un gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*), tres promotores P5, P19, P40 (adenovirus) y un sitio de poliadenilación (poly A) y un origen de replicación en bacterias (*ori*). El sitio de clonación HindIII, se encuentra corriente abajo del promotor P40 (Figura 60).

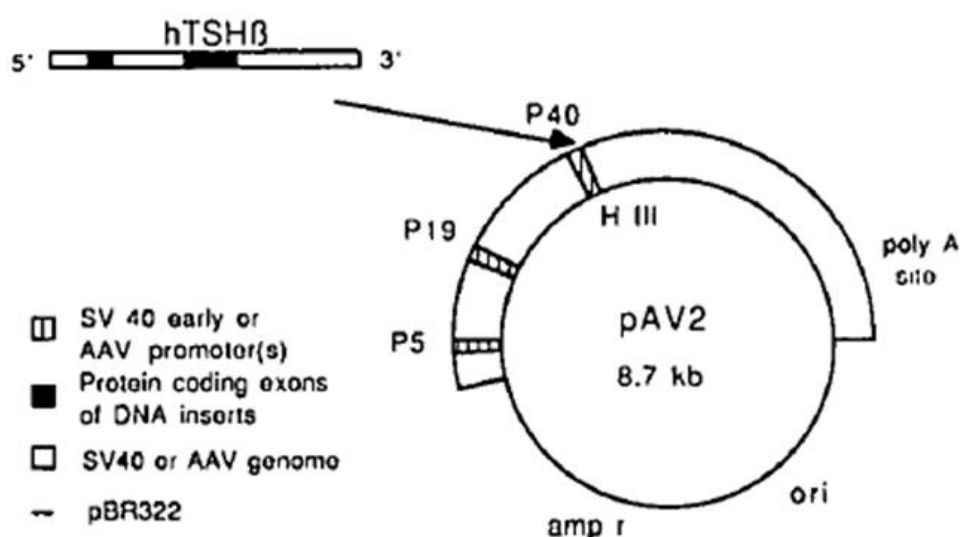


Figura 60: Esquema del vector pAV2 que contiene la secuencia genómica para la expresión de la subunidad beta de TSH humana (Figura modificada de Fredric E. Wondisford y col., 1988).

La secuencia genómica perteneciente a TSH β se encuentra clonada en el sitio HindIII constituyendo de esta manera el vector pAV2hTSHbeta de 10,7 kpb. El vector se recibió liofilizado (1 ng) por lo que se reconstituyó en buffer TE y se conservó a -20 °C. Con el objetivo de generar un stock en bacterias del mismo, una fracción se utilizó para transformar células *E. coli DH5alpha* utilizando la técnica de shock térmico. Cada clon se evaluó por extracción del vector empleando el kit comercial *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Biodynamics) y posterior análisis por corte con enzima de restricción (HindIII), seguido de electroforesis en gel de agarosa (1%) y en presencia de un marcador de peso molecular (ADN Fago Lambda cortado con HindIII).

El protocolo general utilizado para todos los ensayos de transfección con el vector pAV2hTSHbeta en células CHO_K1 y HEK_293 fue básicamente el mismo que se describió anteriormente. La expresión del antígeno recombinante (TSH β) se evaluó en sobrenadante de cultivo, luego de las 48 horas de realizada la transfección, por ELISA *sandwich* utilizando anticuerpos producidos durante el trabajo de tesis.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Expresión de polipéptidos en cultivos de células procariotas

En primer lugar, para la obtención de antígenos recombinantes, se evaluó una estrategia de clonado de polipéptidos representativos de los exones codificantes 2 (TSHe2) y 3 (TSHe3) del gen de la cadena β de TSH humana, expresados en células procariotas (*E. coli*). Cada porción molecular fue fusionada a la proteína GST con el fin expresar y purificar antígenos destinados a la inoculación de ratones para el desarrollo de ensayos de fusión celular orientados a la preparación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-hTSH.

Fracciones de los extractos purificados fueron evaluados por SDS-PAGE y en ambos casos se observó la presencia de las proteínas con un grado de pureza superior al 90%, tanto para GST-TSHe2 como para GST-TSHe3. Una semana luego de finalizado los protocolos de inmunización, se evaluó la respuesta inmune de ratones inmunizados con los antígenos recombinantes basados en porciones moleculares de la hormona TSH fusionadas a GST (GST-TSHe2 y GST-TSHe3) mediante ensayos de ELISA específico indirecto. Se observó que en todos los casos la respuesta inmune fue positiva en comparación con los sueros obtenidos previa inmunización. Sin embargo, los antisueros mostraron una baja o nula reacción frente a la proteína hTSH nativa.

Como se describió en el Capítulo III, la hormona hTSH es una glicoproteína heterodimérica, formada por una subunidad α y una subunidad β [80]. La síntesis de una molécula madura de hTSH es compleja y requiere de la escisión de péptidos señal de ambas subunidades α y β , seguido de la edición de residuos de manosa y la adición moléculas de fucosa, galactosa y ácidos siálicos. En mamíferos contienen entre un 15 y 45% de su masa total que corresponde los oligosacáridos que las integran [75]. Si bien es sabido que las células procariotas son incapaces de realizar estas modificaciones postraduccionales, buscábamos alguna posibilidad de reproducir epitopes presentes en la subunidad β de la hormona nativa. A su vez, la presencia de residuos modificados condiciona las características inmunogénicas de la hormona. La ausencia de estas

modificaciones en los polipéptidos expresados en *E. coli* podrían explicar la baja o nula reactividad de los antisueros de los ratones inmunizados con GST-TSHe2 y GST-TSHe3 frente a hTSH. Por este motivo se decidió dejar de lado la expresión de antígenos recombinantes en células procariotas e incorporar al instituto herramientas para la expresión de proteínas en cultivos de células animales.

2.3.2. Expresión de TSH β en cultivos de células eucariotas

Los primeros ensayos realizados en nuestro laboratorio estuvieron destinados a evaluar la transfectabilidad de las células eucariotas y a optimizar las condiciones de transfección utilizando el lípido catiónico PEI. Se estudiaron distintas proporciones de PEI/ADN (pEGFP_C3) y la eficiencia se evaluó por microscopía de fluorescencia de las células transfectadas. Como se muestra en la Figura 61 (células CHO_K1) y en la Figura 62 (células HEK_293), en ambas líneas celulares la transfección fue exitosa. Si bien hubo expresión de GFP con cualquier masa de ADN comprendida entre 1 y 0,5 μg /pocillo, los ensayos de transfección sólo fueron efectivos para masas de PEI/pocillo comprendidas entre 0,8 - 1 μg /pocillo. Para masas de PEI/pocillo de 0,5 μg la incorporación de ADN transgénico fue muy baja o nula (recuadros A2 y C2 en cada caso).

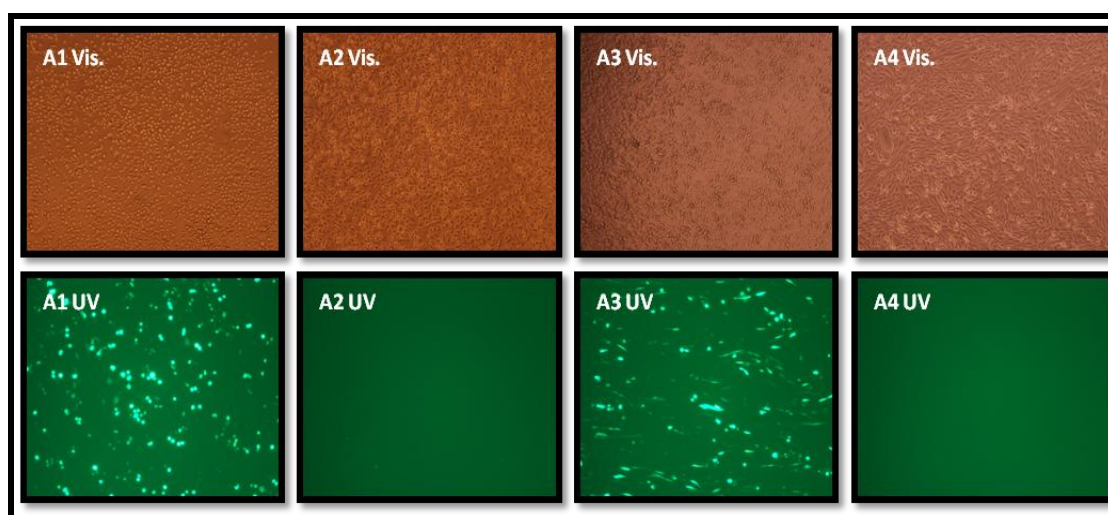


Figura 61: Células CHO_K1 transfectadas con el vector pEGFP_C3 y utilizando distintas proporciones de PEI/ADN. Para cada caso se muestran imágenes en el espectro de luz visible (Vis.) y el mismo campo en el espectro de luz ultravioleta (UV). A1: 1 μg ADN / 1 μg PEI; A2: 1 μg ADN / 0,5 μg PEI; A3: 0,5 μg ADN / 1 μg PEI; A4: control negativo.

Por otro lado, observamos que las células HEK_293 se aglutinaban fácilmente durante los ensayos. Esta situación pudo corregirse evitando someter a las células a sucesivas etapas de lavado.

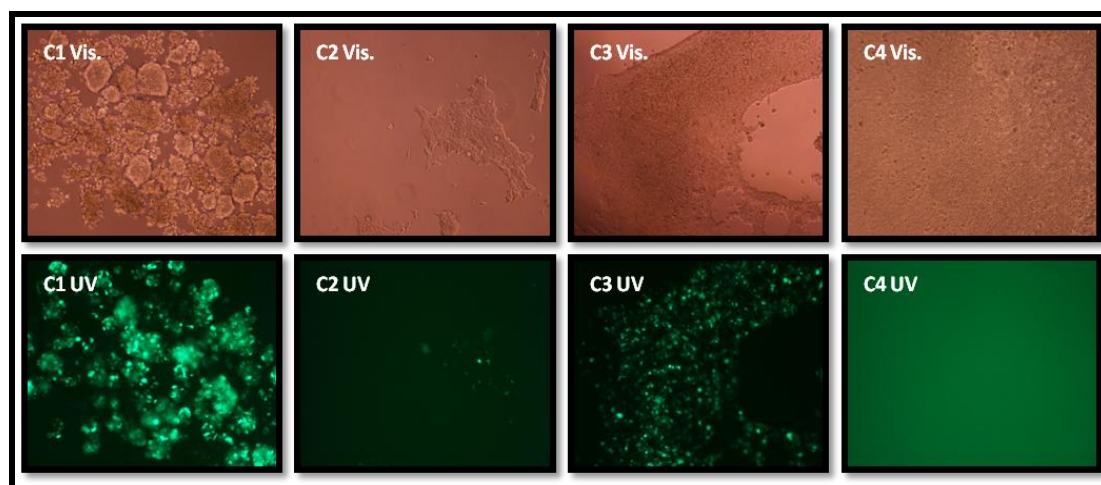


Figura 62: Células HEK_293 transfectadas con el vector pEGFP_C3 y utilizando distintas proporciones de PEI/ADN. Para cada caso se muestran imágenes en el espectro de luz visible (Vis.) y el mismo campo en el espectro de luz ultravioleta (UV). C1: 1 μ g ADN / 1 PEI; C2: 1 μ g ADN / 0,5 μ g PEI; C3: 0,5 μ g ADN / 1 μ g PEI; C4: control negativo.

Luego de verificar la transfectabilidad de las líneas celulares CHO_K1 y HEK_293, utilizando el vector pEGFP_C3, establecimos las condiciones óptimas de cultivo para cada una de las líneas y se determinó la relación de ADN/PEI más eficiente para la realización de ensayos de transfección en placas de 24 pocillos. Como se muestra en la Figura 63, la eficiencia de transfección fue elevada, evidenciada por los altos niveles de expresión de GFP.

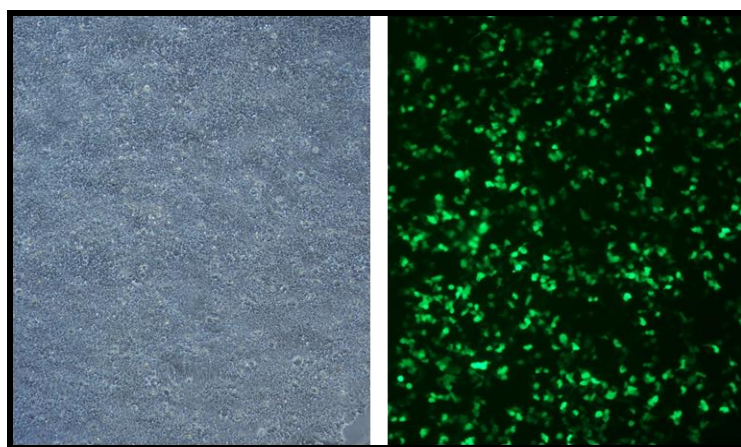


Figura 63: Células CHO_K1 de 48 horas de transfectadas con el vector pEGFP_C3 y utilizando una proporción de PEI/ADN de 0,9/0,9 (μ g/ μ g) por pocillos. Se muestran imágenes en el espectro de luz visible (Izq.) y el mismo campo en el espectro de luz ultravioleta (Der.).

Para llevar a cabo la expresión del antígeno recombinante (TSH β) se continuó trabajando con ambas líneas celulares y utilizando el vector pAV2hTSHbeta (ATCC). Este vector está compuesto una secuencia de 2 kpb perteneciente al fragmento genómico de los dos exones codificantes de TSH β , y los componentes pertenecientes al plásmido pAV2 de 8,7 kpb [136]. Dado que la secuencia codificante de la subunidad beta de TSH se encuentra clonada en el sitio HindIII del vector, se evaluó la presencia y el tamaño de las secuencias de interés luego del corte con la enzima de restricción correspondiente en comparación con ADN de fago lambda cortado con la misma enzima. De esta manera se verificó la presencia de los fragmentos de 2 kpb (TSH β) y 8,7 kpb (pAV2) respectivamente, por lo que se consideró exitosa la generación del stock del vector (Figura 63).

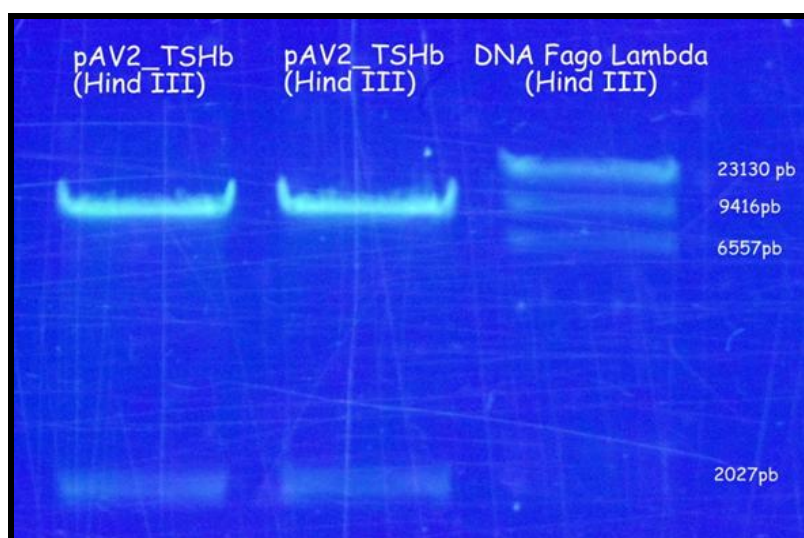


Figura 64: Análisis en gel de agarosa (1% P/V) de los fragmentos de ADN pertenecientes al vector pAV2hTSHbeta (ATCC) y a ADN de fago Lambda (marcador de tamaño molecular) cortados con la enzima de restricción HindIII. Se observa un fragmento 2kpb perteneciente al fragmento de ADN codificante de TSH β y un fragmento cercano a los 9 kpb correspondiente al tamaño del vector pAV2.

Los ensayos de transfección con el vector pAV2hTSHbeta se realizaron utilizando el lípido catiónico PEI, en placas de 24 pocillos y en ambas líneas celulares. La determinación de TSH β en sobrenadante de cultivo se realizó mediante ensayos de ELISA *sandwich*, utilizando combinaciones de anticuerpos que habían sido evaluados para la detección de la hormona nativa, todos obtenidos durante el desarrollo del trabajo de tesis. De esta forma, durante los ensayos de expresión de TSH β en células eucariotas se estudiaron dos aspectos: la expresión del antígeno recombinante y su secreción al

sobrenadante de cultivo, y (2) la selección de una combinación de anticuerpos con capacidad de detectar TSH β recombinante mediante ELISA *sandwich*.

Luego de numerosos ensayos de transfección pudimos detectar la presencia de la subunidad β de la hormona hTSH en los sobrenadantes de cultivos con algunos de los pares de MAbs utilizados (Figura 65). Hasta la fecha sólo pudimos determinar la presencia cualitativa del antígeno presente en el sobrenadante de cultivo, en comparación con los respectivos controles negativos. Pensamos que las dificultades de detección que encontramos se deben a factores inherentes a los bajos niveles de expresión y/o a limitaciones propias de los anticuerpos utilizados para los ensayos de ELISA *sandwich*. Los niveles de expresión, según los autores que clonaron el fragmento de ADN que contiene los exones codificantes de la subunidad beta de TSH humana en el vector pAV2, son considerablemente bajos [136,137]. A su vez han reportado la cotransfección con otros vectores (pVARNA) para lograr aumentar los niveles de expresión. En la Figura 65 se muestra un gráfico donde se evaluó la presencia de TSH β recombinante en sobrenadante de cultivo (48 horas) de células HEK_293, mediante ELISA *sandwich* con diversas combinaciones de MAbs (captura y detección).

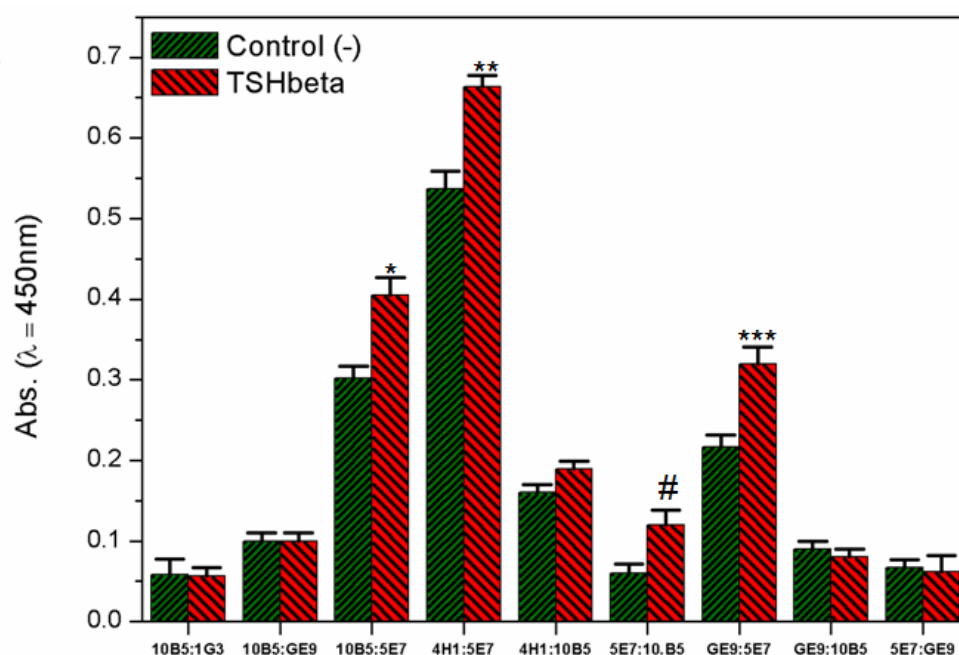


Figura 65: Detección de TSHbeta (TSH β) recombinante en sobrenadante de cultivos de células HEK_293 transfectadas con el vector pAV2hTSHbeta por ELISA *sandwich* empleando distintas combinaciones de anticuerpos anti-hTSH (10B5:1G3; 10B5:GE9; 10B5:5E7; 4H1:5E7; 4H1:10B5; 5E7; 10B5; GE9:5E7; GE9:10B5; 5E7:GE9). (*), (**), (***) y (#): Representan diferencias significativas en relación al respectivo control negativo (sobrenadante de cultivo de células sin transfectar).

De los nueve pares de MAbs seleccionados para detectar el antígeno en sobrenadante de cultivos, 4 mostraron capacidad de detección específica del mismo (Figura 65). Estos ensayos se llevaron a cabo cuando ya disponíamos de prototipos de ELISA e IPCR. Si bien no se continuaron los ensayos de producción recombinante de TSH β y falta desarrollar numerosas etapas hasta obtener el antígeno purificado, consideramos estos resultados y las herramientas desarrolladas recursos promisorios para la transgénesis de células eucariotas con diversos fines en nuestro instituto.

3. Obtención de MAbs por fusiones en medio semisólido

3.1. Introducción

Dada la dificultad que teníamos para obtener MAbs dirigidos contra epitopes específicos de la subunidad β de hTSH (descrita en el punto 1 de este Anexo), ausentes en el resto de las hormonas, decidimos evaluar otras estrategias para el aislamiento de clones específicos obtenidos por tecnología de hibridomas.

Durante las etapas de cultivo celular en los ensayos de fusión celular, un problema habitual es que algunas colonias de hibridomas sobrecrecen sobre otras antes del proceso de clonación. A menudo, estas células de crecimiento más rápido no sintetizan anticuerpos, lo que resulta en un problema para aislar los hibridomas deseados. Una posible solución a este problema es clonar los hibridomas después de la fusión usando medios semisólidos [138-140]. Por ello, llevamos a cabo ensayos de fusión en medio semisólido utilizando el kit comercial ClonaCell[®]-HY (Stem Cell Technologies).

ClonaCell[®]-HY es un medio semisólido formulado en base a metilcelulosa suplementado con factores de crecimiento, optimizado para favorecer el crecimiento y la selección de hibridomas. El método ClonaCell[®]-HY está diseñado para seleccionar y aislar clones inmediatamente después de realizada la fusión. Ésto elimina la posibilidad de perder clones potencialmente valiosos, de crecimiento lento, debido al sobrecrecimiento de clones de rápida proliferación. La selección de HAT y la clonación de hibridomas se realizan simultáneamente en un solo paso, lo que resulta en un ahorro sustancial de tiempo.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Inmunización de ratones

Se utilizaron ratones tratados con uno de los protocolos de inmunización descritos en la Tabla 1 del Capítulo III. Brevemente, 2 ratones BALB/c, machos y de 8 semanas de edad, fueron inicialmente inmunizados con 20 μ g de hTSH en PBS y ACF (IP). Posteriormente, cada 7 o 21 días se realizaron refuerzos sucesivos de exposición al antígeno con 5 μ g en PBS-AIF, por vía IP (Protocolo F). Dentro de los 10 días posteriores al último refuerzo se realizó un ensayo de ELISA específico indirecto para la determinación del título de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados. Tres días antes de cada fusión, los animales se reestimularon con el antígeno disuelto en PBS.

3.2.2. Fusión celular y Selección de clones anti-hTSH

Para los ensayos de fusión se utilizó el kit comercial ClonaCell®-Flex (Stem Cell Technologies), un concentrado de metilcelulosa en agua (2X), que permite la selección y clonación de líneas celulares por formación de colonia en medio semisólido. Los medios y suplementos utilizados para el cultivo de hibridomas fueron, a excepción de uno (E), idénticos a los descritos en el punto 3.3 del Capítulo III.

- A. D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium: 4,5 gr/l de D-Glucosa L-Glutamina; 110 mg/l de Piruvato de Sodio 0,11 g/l; Gibco) suplementado con sulfato de gentamicina (Parafarm) 50 µg/ml; Tylosina (Sigma-Aldrich) 8 µg/ml; Pen-Strep-Fungi 100X (Gibco).
- B. Medio de cultivo A suplementado con SFB 2,5% V/V.
- C. Medio de cultivo A suplementado con SFB 10% V/V.
- D. Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% V/V.
- E. ClonaCell™ Flex suplementado con medio de cultivo D (2X) y HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM, aminopterina 400 nM y timidina 0,016 nM.
- F. Medio de cultivo A suplementado con SFB 20% V/V suplementado con HT (Hipoxantina-Timidina; Gibco) en una concentración final de hipoxantina 0,1 nM y timidina 0,016 nM.

Al igual que con las fusiones realizadas en medio líquido, la metodología para la preparación de hibridomas en medio semisólido se realizó en base a la técnica descrita por Galfré y Milstein en el año 1981 [89] y siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante del kit (ClonaCell®-HY - Hybridoma Cloning Kit, STEM CELL Technologies). Los ratones hiperinmunes se sacrificaron por dislocación cervical y en condiciones de esterilidad se extrajo el bazo. Este órgano se lavó con medio de cultivo B, se disgregó con tijera y el producto de la disgregación se filtró por un tamiz de malla fina. El filtrado se centrifugó durante 10 minutos a 200g y las células se resuspendieron en 25 ml de medio B. Posteriormente, estas se adicionaron a una suspensión de células NS0 en una proporción 10:1. Los ensayos de fusión se realizaron empleando polietilenglicol (PEG 3350; Sigma-Aldrich) al 50% P/V en PBS estéril. Luego la mezcla celular (NS0 y esplenocitos) se diluyó gradualmente mediante el agregado de

medio de cultivo A, se centrifugó durante 10 minutos a 200g y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 10 ml de medio D, se transfirieron a un Ft (75 cm²) con 20 ml de de medio D (Volumen total: 30 ml) y se incubaron a 37 °C en estufa gaseada (5% de CO₂). Luego de 16 – 24 horas de incubación, la suspensión de células fusionadas se centrifugó a 1.400 rpm (TA), se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 10 ml de medio D. Estos 10 ml de suspensión celular se transfirieron a un frasco con 90 ml de medio E. Se mezcló completamente invirtiendo suavemente la botella varias veces y se dejó reposar durante 15 minutos (37 °C) para eliminar las burbujas. Usando una pipeta serológica (10 ml) se dispensaron 10 ml de de suspensión celular en cada una de las diez placas de Petri de 100 mm y se incubaron las a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.

Luego de 10 – 14 días se pudieron verificar la presencia de colonias. Utilizando micropipeta y *tips* estériles de 10 µl, se extrajeron las colonias (clones) y se plaquearon en pozos individuales (placas de 96 pocillos) con 150 µl de medio F. A partir de los 4 días, aquellos pozos que presentaban alta densidad celular y viraje del color del medio (amarillo) fueron evaluados por ELISA específico indirecto (hTSH). Aquellos clones que resultaban positivos, eran gradualmente expandidos, caracterizados y evaluados siguiendo los protocolos descritos en el Capítulo III (3.9 - 3.15).

3.3. Resultados y Discusión

Como resultado, durante los ensayos de producción de MAbs específicos por tecnología de hibridomas en medio semisólido, se seleccionaron y criopreservaron más de 25 clones específicos. Al igual que en los casos anteriores, los clones obtenidos se clasificaron por ELISA específico indirecto, en función del reconocimiento a las distintas hormonas relacionadas (hTSH, r-hFSH, hLH, hCG). Todos los MAbs obtenidos pertenecieron al grupo MAbs $\beta_{(a)}$, es decir, reconocen a hTSH pero también presentan reacciones intermedias frente a una o más de las otras hormonas evaluadas (r-hFSH, hLH y hCG). Dado que no encontramos clones específicos para la subunidad β de TSH (MAbs β), sólo unos pocos que presentaban características favorables de reactividad y proliferación fueron seleccionados para expansión y purificación. A partir de los clones purificados, se determinó la K_{aff} aparente y no encontramos diferencias significativas con los MAbs obtenidos en fusiones anteriores en medio líquido. Los MAbs que fueron purificados se incorporaron al panel y se evaluaron como anticuerpos de captura en los ensayos de ELISA *sandwich* combinándolos con MAbs obtenidos en

fusiones previas, pertenecientes al grupo de los β -específicos. Ninguna de las combinaciones evaluadas con estos anticuerpos evidenció ventajas o mejoras con respecto a la captura del antígeno y en relación a los prototipos ya obtenidos. Consideramos que, si bien no logramos incorporar al panel anticuerpos β -específicos, las principales ventajas de realizar ensayos de fusión en medio semisólido pueden resumirse en los siguientes puntos:

- En relación a los métodos estándar de selección y clonación de hibridomas, en los ensayos realizados en medio semisólidos estas etapas se realizan en un solo paso, minimizando tanto el tiempo como los materiales necesarios.
- La clonación directa evita la pérdida de clones de crecimiento lento potencialmente valiosos.
- Las colonias de hibridomas son monoclonales desde el principio, por lo que no es necesario volver a clonar (DL).

Dentro de las desventajas técnicas que notamos al emplear esta metodología están los aspectos asociados al pasaje de los clones desde el medio semisólido a las placas de 96 pozos (medio líquido). Esta etapa implica cierta dificultad, ya que el pasaje de 500 – 1000 clones (colonias) es muy engorroso, variable y sólo una fracción prolifera hasta ser evaluada por ELISA.

4. Evaluación de otros formatos de ELISA *sandwich*

4.1. Introducción

En el Capítulo III se describió la obtención de un panel de MAbs anti-hTSH. De todos los pares de MAbs con capacidad de detección de hTSH, se seleccionaron dos que presentaban las mejores características funcionales y a los cuales se los denominó prototipos B-4 y B-9. Luego de un proceso de optimización, cada prototipo se evaluó frente a estándares de referencia y en comparación con un kit comercial (Capítulo IV, punto 4.5., Figura 38). En ambos casos (B-9 y B-4) se obtuvo una respuesta lineal en todo el rango de concentraciones evaluado (0,01 – 15 μ UI/ml). Los valores de LD obtenidos, definidos como la menor cantidad de antígeno que puede ser distinguido de la muestra en ausencia del mismo (blanco), dentro de un límite de confianza establecido [111], fue de 0,1 μ UI/ml para todos los casos. Si bien los parámetros funcionales entre los ensayos fueron similares (precisión, exactitud, especificidad), el kit comercial evidenció la mejor performance analítica en términos de la pendiente de la curva de calibración. Dado que B-9 mostró la mejor performance entre los dos ensayos de ELISA *sandwich* desarrollados, decidimos continuar el trabajo de tesis utilizando sólo éste par de MAbs.

Con el fin obtener mejoras en la capacidad de detección y cuantificación del ELISA *sandwich* con B-9, se estudiaron variantes asociadas a la adsorción de los anticuerpos de captura en fase sólida y al sistema de generación de señal colorimétrica. Por un lado se estudiaron estrategias que pudieran favorecer la orientación de los anticuerpos. Dado que la proteína A puede unirse selectivamente a la porción Fc de las inmunoglobulinas G [141] o que la molécula de neutravidina se une con extraordinaria especificidad y afinidad a la molécula de biotina [33], evaluamos el pretratamiento de placas de ELISA con proteína A o neutravidina (Figura 66, A y B) y analizamos su influencia en la performance del prototipo de ELISA *sandwich* desarrollado.

Por otro lado, se evaluó un método alternativo para la generación y amplificación de la señal colorimétrica, utilizando el reactivo comercial AMDEX. Este reactivo está compuesto por la conjugación covalente de múltiples moléculas de enzimas (HRP) a una única molécula de estreptavidina (STV) a través de una cadena principal de polímero dextrano (Figura 67). Múltiples cadenas del polímero aumentan la capacidad de detección debido a que proveen mayor contribución de enzimas HRP por mol de biotina y así, amplifican considerablemente la señal colorimétrica de la enzima peroxidasa en comparación con las formulaciones convencionales de STV-HRP. La

amplificación en la señal de detección, con el consecuente incremento de la capacidad de detección, se puede lograr sin realizar modificaciones relevantes en los protocolos establecidos de los inmunoensayos. En principio, en la mayoría de los sistemas de ELISA tradicionales, el conjugado STV-HRP existente o el conjugado de fosfatasa alcalina pueden sustituirse directamente por el sistema AMDEX.

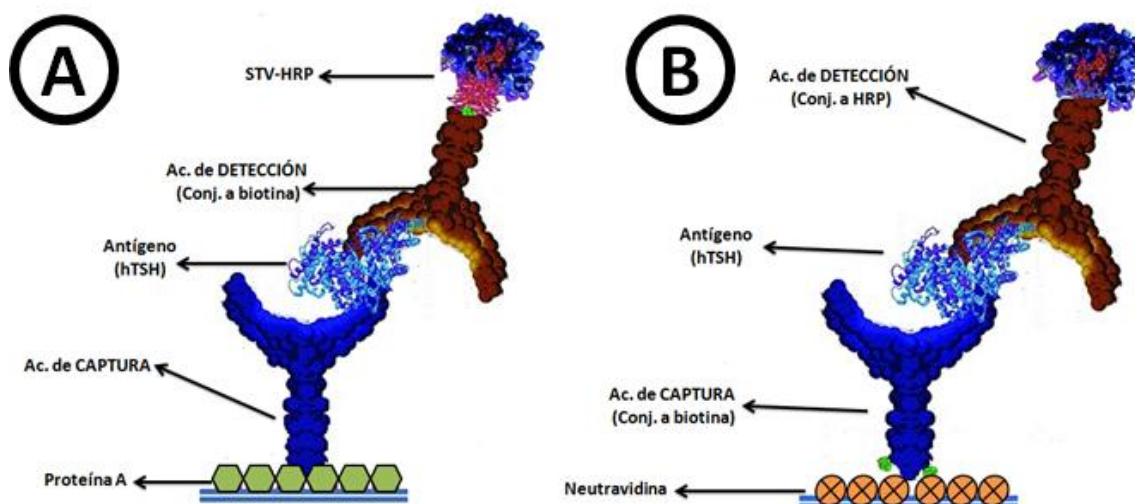


Figura 66: Formatos de ELISA sandwich donde se emplean distintas estrategias para la adsorción de anticuerpos de captura en fase sólida. (A): Pre-sensibilización de placas de ELISA con proteína A. Interacción proteína A – región Fc del MAb de captura del ensayo de ELISA sandwich. (B) Pre-sensibilización de placas de ELISA con neutravidina. Interacción neutravidina – MABs de captura (conjugado a biotina).

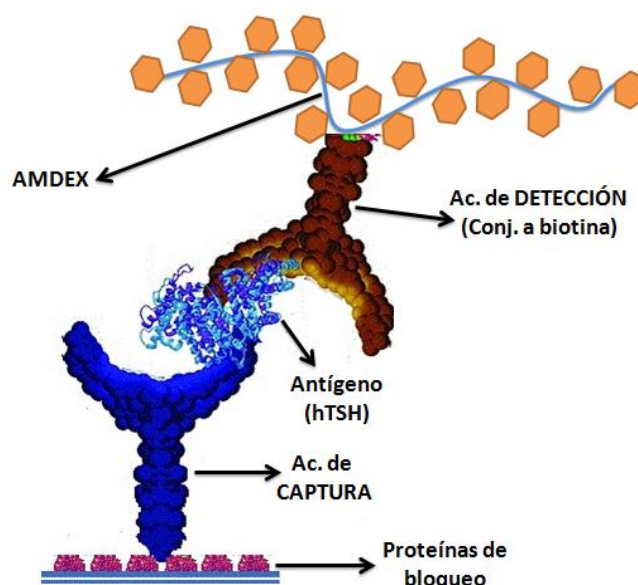


Figura 67: Utilización del reactivo AMDEX en ensayos de ELISA sandwich. Este reactivo está compuesto por múltiples moléculas de enzimas (HRP) a una única molécula de estreptavidina a través de un polímero de dextrano. De esta manera se logra amplificar considerablemente la señal colorimétrica de la enzima peroxidasa en comparación con las formulaciones convencionales de STV-HRP.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Empleo de proteína A en ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH

La proteína A (42 kDa) es un receptor de membrana celular producido por varias cepas de *Staphylococcus aureus*. Posee la capacidad de unirse a la porción Fc de las inmunoglobulinas, especialmente IgG, de un gran número de especies [142]. A su vez, se ha demostrado que una molécula de proteína A se une al menos a 2 moléculas de IgG simultáneamente [141]. Con el fin condicionar la orientación de los MAbs de captura y obtener un incremento en la capacidad de detección en los ensayos de ELISA *sandwich* para TSH, estudiamos la utilización de placas de ELISA presensibilizadas con proteína A (Sigma-Aldrich). Para evaluar la funcionalidad de la proteína A, utilizando el formato descrito en la Figura 66-A, se realizaron los ensayos que se describen a continuación:

A. Sensibilización de placas de ELISA con proteína A

El estudio de las condiciones óptimas de sensibilización de las placas con proteína A se realizó mediante ensayos de ELISA. El esquema de los ensayos se describen brevemente a continuación:

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 μ l/pozo de proteína A (Sigma-Aldrich), en concentraciones de 1 – 5 – 10 – 20 – 50 y 100 μ g/ml, diluida en búfer carbonato (pH = 9,6) o PBS (pH = 7,5). Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C o TA.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica (placa) se realizó con 200 μ l/pozo de PBS-BSA-T. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Anticuerpos: se agregaron 100 μ l/pozo (1:2000) de anticuerpos policlonales de conejo conjugados a HRP (ISAL) o MAbs anti-TSH (1:1000) conjugados a HRP. Todas las placas se incubaron durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Revelado: se empleo el sustrato cromogénico TMB (Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensan 100 μ l/pozo de TMB. Se incubó en oscuridad y TA. Luego de 5 – 15 minutos la reacción colorimétrica se detuvo con 100 μ l/pozo de H₂SO₄ 12%. La lectura del color generado se efectuó a λ = 450 nm en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).
- 5) Controles: (-) Pocillos sin sensibilizar con proteína A.
 (-) Búfer de dilución de anticuerpos.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

B. Bloqueo de la unión de proteína A a otros anticuerpos

Se evaluaron condiciones del ensayo que pudieran bloquear la unión de la proteína A frente al anticuerpo secundario (MAb de detección). Brevemente:

- 1) Sensibilización: placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de proteína A (Sigma-Aldrich), en una concentración de 1 – 5 – 10 – 20 – 50 y 100 µg/ml, diluida en PBS (pH = 7,5) e incubadas toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo: el bloqueo de los sitios de unión inespecífica (placa) se realizó con 200 µl/pozo de PBS-BSA-T. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.
- 3) Anticuerpo Primario (Captura): se agregaron 100 µl/pozo de anticuerpo de captura (MAb captura B-9) en concentraciones comprendidas entre 100 y 2 µg/ml. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 4) Bloqueo 2 (proteína A): se agregaron 100 µl/pozo (100 – 1 µg/ml) de anticuerpos policlonales anti-GST (ISAL) hechos en conejo. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 5) Anticuerpo Secundario (Detección): se agregaron 100 µl/pozo de MAb de detección (B-9) en una concentración final de 10 µg/ml en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 6) Conjugado Enzimático: Se agregaron 100 µl/pozo de estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluida 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 hora a 37 °C.
- 7) Revelado: ídem punto 4) del ensayo descrito anteriormente.
- 8) Controles: (-) Sin bloqueo 2. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
(-) Sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.
(+) Anti-mouse conjugado a HRP hecho en conejo (ISAL).

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

4.2.2. Empleo de neutravidina en ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH

Se emplearon placas de unión a biotina de poliestireno (Thermo Fisher Scientific; *NeutrAvidin Protein Coated Clear 96-Well Plates*). Estas placas son pretratadas con neutravidina y prebloqueadas, listas para usar en inmunoensayos con anticuerpos biotinilados. Con el fin obtener mejoras cualitativas en los ensayos de ELISA *sandwich* para TSH, estudiamos la utilización de estas placas, empleando el formato descrito en la Figura 66-B.

Es importante destacar que, a diferencia del formato de ELISA *sandwich* empleado para la detección de TSH en suero humano, descrito en el Capítulo IV, aquí utilizamos la interacción neutravidina-biotina para adsorber los MAb de captura en fase sólida y no para la interacción con el complejo enzimático STV-HRP (Capítulo III, Figura 20). De manera que al utilizar las placas de unión a biotina, necesariamente debemos modificar la configuración del ensayo: empleamos el MAb de captura conjugado a biotina (adsorción en fase sólida vía interacción neutravidina-biotina) y el MAb de detección directamente conjugado a HRP.

El protocolo se describe a continuación:

- 1) Anticuerpo Primario (Captura): en placas de poliestireno de 96 pozos pretratadas con neutravidina (Thermo Fisher Scientific) se dispensaron 100 µl/pozo del MAb de captura (B-9) conjugado a biotina (10 – 100 µg/ml), diluido en PBS o PBS-BSA-T.
- 2) Muestra: 10 ng/ml de hTSH diluida en PBS-L-T. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 3) Anticuerpo Secundario (Detección): se agregaron 100 µl/pozo de MAb anti-hTSH conjugado a HRP (ISAL) diluido 2 - 10 µg/ml en PBS-L-T. Se incubó durante 1 hora 30 minutos a 37 °C.
- 6) Revelado: se empleo el sustrato cromogénico TMB (Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensan 100 µl/pozo de TMB. Se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente (TA). Luego de 5 – 15 minutos la reacción colorimétrica se detiene con 100 µl/pozo con Solución Stop (H₂SO₄ 12%). La lectura del color generado se efectuó a $\lambda = 450$ nm en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).

- 4) Controles: (-) sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
 (-) sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con Solución de Lavado.

4.2.3. Empleo de AMDEX en ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH

La utilización del reactivo AMDEX permite obtener mejoras significativas de detección en los inmunoensayos. Como ya se describió anteriormente, este reactivo está compuesto por la conjugación covalente de múltiples moléculas de enzimas (HRP) a una única molécula de estreptavidina (STV) a través de una cadena principal de polímero dextrano. Esto genera una considerable amplificación de la señal colorimétrica en comparación con las formulaciones convencionales de STV-HRP. Los ensayos de ELISA *sandwich*, empleando el reactivo AMDEX, se realizaron siguiendo básicamente el protocolo optimizado para el par B-9, sustituyendo el conjugado STV-HRP por el sistema AMDEX (Figura 67). Este reactivo fue provisto generosamente por el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) de la FBCB. Brevemente:

- 8) Sensibilización (anticuerpo de captura): placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo de cada MAbs anti-hTSH seleccionado (10 µg/ml en solución de sensibilización). Se incubó toda la noche a 4 °C.
- 9) Muestras + MAb de detección: se agregaron 100 µl/pozo de hTSH diluida en PBS-L-T (0,1 – 20 µUI/ml) y en simultaneo 100 µl/pozo del anticuerpo de detección diluido en PBS-L-T (10 – 5 – 1 µg/ml). Se incubó durante 2 horas a TA.
- 10) Conjugado Enzimático (AMDEX): Se agregaron 100 µl/pozo del complejo polimérico AMDEX (*Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate*; GE Healthcare) diluido 1:20.000 en solución diluyente. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C.
- 11) Revelado: se empleó el sustrato cromogénico TMB (Sigma-Aldrich). Luego del lavado, se dispensaron 100 µl/pozo del reactivo cromogénico. Se incubó en oscuridad y a TA. La reacción colorimétrica se detuvo agregando 100 µl/pozo de H₂SO₄ 12% (Solución Stop). La lectura del color generado se efectuó a $\lambda = 450$ nm, en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX; Thermo).

- 12) **Controles:** (-) Sin antígeno. La muestra fue reemplazada por solución diluyente.
(-) Sin anticuerpo secundario. Se reemplazó por solución diluyente.
(+) Conjugado enzimático STV-HRP 1:1000.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron 10 lavados con solución de lavado (PBS-T). Los ensayos fueron realizados por triplicado.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Estrategias para la adsorción de anticuerpos de captura en fase sólida

Con el objetivo de obtener un incremento en la capacidad de detección del prototipo de ELISA *sandwich* B-9, estudiamos distintas estrategias que pudieran condicionar favorablemente la adsorción y la orientación de los anticuerpos de captura del antígeno. Por un lado evaluamos el uso de placas sensibilizadas con proteína A (Figura 66-A), y por otro lado la utilización de placas comerciales pretratadas con neutravidina (Figura 66-B).

Se determinó que las condiciones óptimas de sensibilización fueron: 20 µg/ml (proteína A), PBS (pH = 7,5) e incubación ON a 4 °C. Posteriormente se evaluaron alternativas para bloquear las posibles uniones de la proteína A con el MAb de detección. En todos los casos evaluados para el bloqueo de las uniones indeseadas a proteína A no logramos reducir el *background*, obteniendo altos niveles de señal inespecífica producido fundamentalmente por la adsorción del MAb de detección (conjugado a HRP). Si bien los anticuerpos de captura se unen a la proteína A, las etapas sucesivas que involucran anticuerpos secundarios también se unen generando el incremento en la señal de *background*. Dado que no encontramos forma de bloquear efectivamente esas uniones secundarias, la estrategia de adsorción de anticuerpos de detección mediante la sensibilización de placas con proteína A fue dejada de lado.

La utilización de placas comerciales pretratadas con neutravidina implicó la modificación de las características de conjugación de los MAbs que componen el prototipo B-9: empleamos el MAb de captura conjugado a biotina (adsorción vía interacción neutravidina-biotina) y el MAb de detección directamente conjugado a HRP. Si bien, a diferencia de la estrategia anterior (proteína A), con este formato sí pudimos llegar a realizar ensayos de ELISA *sandwich* anti-hTSH, no se obtuvieron mejoras. Incluso las señales de detección fueron muy débiles en todos los casos.

Consecuentemente, Por esta razón, se descartaron estas pruebas y se decidió no realizar cambios en la estrategia de adsorción de anticuerpos en fase sólida.

4.3.2. Amplificación de la señal colorimétrica mediante AMDEX

Evaluamos la utilización del reactivo comercial AMDEX, que es un conjugado enzimático polimérico que permite la generación y amplificación de la señal colorimétrica otorgando mejoras significativas en la capacidad de detección de los inmunoensayos. Para ello, se sustituyó el conjugado STV-HRP por el sistema AMDEX, como se muestra en la Figura 67, estableciéndose una dilución de AMDEX 1:20.000 y concentraciones del antígeno (hTSH en PBS-L-T) comprendidas entre 0,1 y 20 μ UI/ml. En la Figura 68 se muestran las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de ELISA *sandwich* utilizando AMDEX, con tres tiempos de reacción para la generación de color (AMDEX 1, AMDEX 2 y AMDEX 3) y en comparación con el sistema tradicional (STV-HRP). De los tiempos de reacción estudiados para el sistema AMDEX (5, 10 y 15 minutos) se obtuvieron incrementos en los valores de absorbancia pero con pérdida de la linealidad de la curva de calibración cuando se superaban los 5 minutos de incubación con el agente cromogénico (TMB). Si bien los controles negativos se mantenían estables, a tiempos mayores de reacción (Ej. 30 minutos) todos los puntos de la curva de calibración llegaban a la saturación. Por esta razón seleccionamos un tiempo de 5 minutos como la condición óptima de revelado. En las condiciones estudiadas y en comparación con el sistema tradicional (STV-HRP), se logra un pequeño incremento en la pendiente de la recta (Tabla 13) y una reducción del tiempo operativo del ensayo. En la Tabla 13 comparamos los parámetros de las rectas de calibración obtenidos para el sistema AMDEX 3 (tiempo de reacción: 5 minutos) con los de STV-HRP (tiempo de reacción: 30 minutos). El ajuste lineal es muy similar, con un pequeño aumento de la pendiente en el primer caso. Dado que no obtuvimos un incremento considerable en la performance del ensayo, al menos en las condiciones evaluadas, decidimos dejar de lado la utilización del sistema AMDEX y utilizar el formato tradicional de STV-HRP.

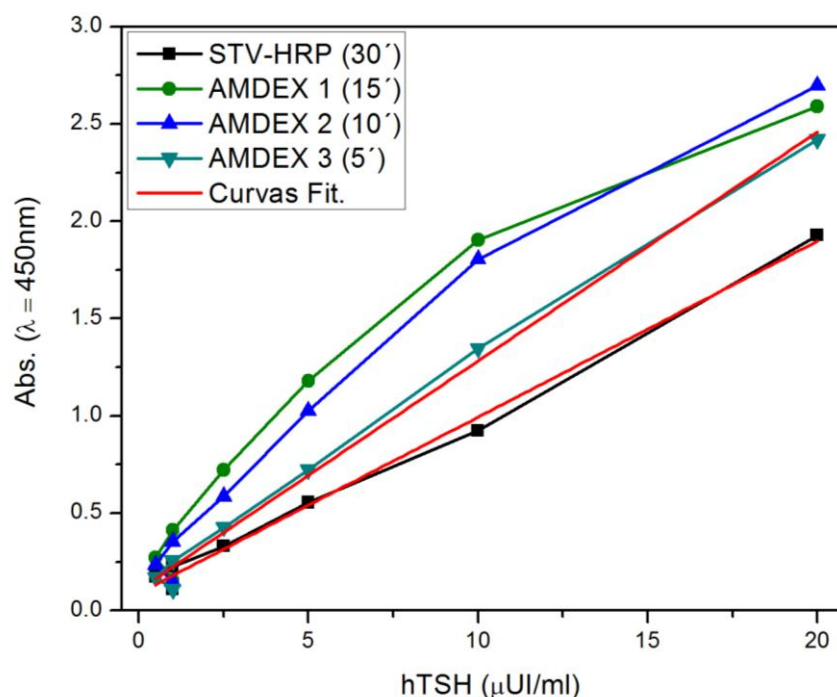


Figura 68: Utilización del reactivo AMDEX en ensayos de ELISA sandwich anti-hTSH. Se graficaron tres curvas de calibrado utilizando AMDEX, con tres tiempos de reacción (5, 10 y 15 minutos) para la generación de color (AMDEX 1, AMDEX 2 y AMDEX 3), en comparación con el sistema tradicional (STV-HRP) que posee un tiempo de reacción de 30 minutos. Se puede observar que cuando utilizamos el sistema AMDEX y el tiempo de reacción de color supera los 5 minutos (AMDEX 1 y AMDEX 2) perdemos linealidad, en comparación con AMDEX 3 y STV-HRP.

Tabla 13: Parámetros funcionales del ensayo de IPCR sandwich anti-hTSH. Determinación de los parámetros funcionales del ensayo de IPCR (B-9) para la detección de hTSH en muestras de suero humano. Adj. R-Square (R^2): coeficiente de correlación; Slope (m): pendiente de la recta.

AMDEX 3			
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Adj. R-Square	0.99382		
		Value	Standard Error
	Intercept	0.10751	0.03301
	Slope	0.11754	0.00378
STV-HRP			
Equation	$y = a + b \cdot x$		
Adj. R-Square	0.99281		
		Value	Standard Error
STV-HRP	Intercept	0.09009	0.0274
	Slope	0.09038	0.00314

5. Optimización de ensayos de IPCR

5.1. Introducción

Como los ELISAs, los ensayos de IPCR pueden ser diseñados según diferentes formatos en función, principalmente, del objetivo del experimento. En todos los casos, uno de los componentes claves es la estrategia elegida para unir las sondas de ADN al anticuerpo de detección. La formación de este complejo ADN-anticuerpo es el puente entre el inmunocomplejo adsorbido en fase sólida (reconocimiento del antígeno) y la/s sonda/s de ADN que posteriormente serán amplificadas por PCR (generación de la señal de detección) [30,63,115]. La estrategia más comúnmente utilizada en muchas aplicaciones de IPCR es el denominado formato “Universal”. Este enfoque, inicialmente reportado por Zhou y col. [13] y Ruzicka y col. [14], sustituyó fundamentalmente la utilización de complejos covalentes (ADN-anticuerpo) por la combinación de avidina con anticuerpos y sondas de ADN conjugadas a biotina [15]. Como resultado de su versatilidad, el sistema avidina-biotina y sus complejos homólogos (estreptavidina-biotina y neutravidina-biotina) se han convertido en las estrategias de IPCR más difundidas [42,44,63,65,69,112,113,143,144]. Tanto los anticuerpos biotinilados como los kits de conjugación a biotina están ampliamente distribuidos y comercialmente disponibles. A su vez, la síntesis de sondas de ADN mono- o bi-biotinilada puede realizarse mediante PCR preparativa, utilizando oligonucleótidos modificados (5'-biotina) y kits de purificación de las sondas de ADN también disponibles comercialmente [115,116]. La principal ventaja de este formato es la ausencia de reactivos complejos y de costosos procesos de purificación.

En esta sección, y a partir del prototipo de ELISA *sandwich* B-9, se describen los aspectos técnicos más relevantes que fueron abordados para la optimización del ensayo de IPCR *Universal* para la cuantificación de TSH en suero humano, utilizando tubos de PCR convencionales. Particularmente, se detalla el estudio de diferentes esquemas operativos, la utilización de sondas de ADN mono-biotiniladas, bi-biotiniladas y de complejos pre-ensamblados de ADN-neutravidina, y la utilización de tubos de PCR tratados con una solución de glutaraldehído para la adsorción de anticuerpos en fase sólida. Mediante la optimización de estas variables técnicas pudimos reducir el tiempo total de duración del ensayo, la dispersión entre las réplicas y el *background* o señal inespecífica. Consecuentemente, esto nos permitió obtener mejoras significativas en el límite de detección y en el límite de cuantificación del ensayo de IPCR para la detección de TSH en muestras de suero humano.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1. Ensayos de IPCR *sandwich*: esquema simultáneo Vs. secuencial

Para la optimización del ensayo de IPCR universal nos enfocamos en el estudio de dos esquemas operativos a los cuales denominamos: simultáneo y secuencial. En el esquema simultáneo, se utilizan complejos pre-ensamblados de sondas de ADN y neutravidina (1:100), incubados con el inmunocomplejo adsorbido en fase sólida (MAb de captura – antígeno – MAb de detección conjugado a biotina). Los mismos fueron sensibilizados con 50 µl/tubo del MAb de captura (10 µg/ml), diluido en búfer de sensibilización (pH = 9,6) e incubados ON a 4 °C. Posteriormente, 50 µl/tubo de diluciones sucesivas de hTSH (100 - 1.10^{-3} ng/ml) en PBS-L-T fueron agregadas junto con 50 µl del anticuerpo de detección, también diluido en PBS-L-T (Volumen final/tubo: 100 µl) e incubados por dos horas a TA. En el esquema de secuencial, se agregaron a cada tubo 50 µl de neutravidina diluida en PBS (2 µg/ml), se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron nuevamente los tubos, se dispensaron 50 µl/tubo de sondas de ADN (mono- o bi-biotiniladas) diluidas 1:2000 en PBS y se incubaron 30 minutos a 37 °C. Finalmente, se procedió con la reacción de revelado por PCR en tiempo real (StepOne™, Applied Biosystems™). Las reacciones de PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 20% Eva Green qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica), 20 pM de oligonucleótidos de detección, 75% de agua en un volumen final de reacción de 50 µl. El perfil de temperatura fue el siguiente: desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 90 °C durante 10 segundos, hibridación a 57 °C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 15 segundos. Las curvas de amplificación se analizaron con el *software* del sistema de detección de secuencias (StepOne Software). En el esquema secuencial empleamos una solución de neutravidina y una solución de sondas de ADN que son incubadas en etapas diferentes y sucesivas. En el esquema simultáneo la única diferencia con el protocolo detallado es que 50 µl de complejos pre-ensamblados de ADN-neutravidina (1:100) diluidos 1:2000 en PBS fueron dispensados en cada tubo e incubados 30 minutos a 37 °C. La temperatura de incubación y las condiciones de bloqueo son iguales para ambos esquemas. Todas las incubaciones se realizan en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizan 10 lavados con solución de PBS-T y antes de pasar a la reacción de PCR en tiempo real se efectuaron 10 lavados extras con H₂O_{dd} estéril. Los ensayos se realizaron en tubos de PCR estándar (MicroAmp®, Thermo Fisher Scientific).

5.2.2. Pretratamiento de los tubos de PCR

Con el fin de incrementar la capacidad de adsorción de moléculas sobre las paredes de los tubos de PCR evaluamos una estrategia reportada con frecuencia en la literatura y que es el pretratamiento de tubos de PCR convencionales con glutaraldehído al 0,8% V/V [44,69,71,144,145]. Para esto, se dispensaron 50 μ l de glutaraldehído al 0,8% V/V en tubos estándar de PCR (MicroAmp[®], Thermo Fisher Scientific) e inmediatamente se incubaron en estufa (60 °C) hasta evaporación total (3 horas aproximadamente). Luego de lavar con PBS-T, se sensibilizaron usando 50 μ l/tubo del MAb de captura (10 μ g/ml) diluido en búfer de sensibilización incubados ON a 4 °C. La eficiencia de adsorción de los anticuerpos se evaluó mediante ensayos de ELISA e IPCR *sandwich* y en comparación con tubos sin tratar. La detección del antígeno se hizo en PBS-L-T, en concentraciones comprendidas entre 10 y 0,15 ng/ml (ELISA) o entre 100 y 0,1 ng/ml (IPCR). El ensayo de IPCR *sandwich* se realizó según el esquema simultáneo, utilizando sondas de ADN mono-biotinilado pre-ensambladas con neutravidina (1:100) y diluidas 1:2.000 en PBS. El ensayo de ELISA *sandwich* se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos que para el ensayo de IPCR hasta la adición del anticuerpo de detección biotinilado. A continuación, se añadió en cada tubo de PCR estreptavidina conjugada con peroxidasa (STV-HRP, Sigma), diluida 1:2.000 en PBS-L-T y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Luego, la actividad enzimática se midió por reacción cromogénica (TMB). Para su lectura en espectrofotómetro, se tomó una fracción del líquido de reacción de cada tubo y se depositó en una placa de ELISA.

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Ensayos de IPCR *sandwich*: esquema Simultáneo Vs. Secuencial

En la Figura 69 se muestra el LD logrado en cada uno de los esquemas de IPCR ensayados. En cada caso, se determinó el LD definido como la mínima cantidad del antígeno que puede detectar el sistema y se calcula como la concentración del antígeno correspondiente al valor de ΔC_t que superan al correspondiente valor promedio de ΔC_t del control negativo (CN IPCR) más tres DS. Los resultados obtenidos muestran claramente que el esquema de ensayo simultáneo, utilizando complejos de sondas de ADN bi-biotiniladas y neutravidina pre-ensamblados [Simult./P-E ADN(bi-biot)-Neut.], posee una baja capacidad de detección y elevada dispersión entre las réplicas. Sin embargo, con el mismo esquema pero utilizando complejos pre-ensamblados con sondas de ADN mono-biotiniladas [Simult./P-E ADN(mono-biot)-Neut.], se obtuvo la

mejor, evidenciado por un aumento del LD y una reducción en la dispersión entre las réplicas. Probablemente, los complejos pre-ensamblados con sondas de ADN bi-biotiniladas y neutravidina (complejos oligoméricos de alto peso molecular) incrementen las interacciones inespecíficas entre los componentes del inmunoensayo, generando un aumento de la dispersión entre las réplicas, un aumento del *background* y en consecuencia una reducción en la capacidad de detección. Por otro lado, en los dos esquemas secuenciales donde se utilizan sondas mono- o bi-biotiniladas (Sec./ADN bi-biot y Sec./ADN mono-biot), el LD fue similar.

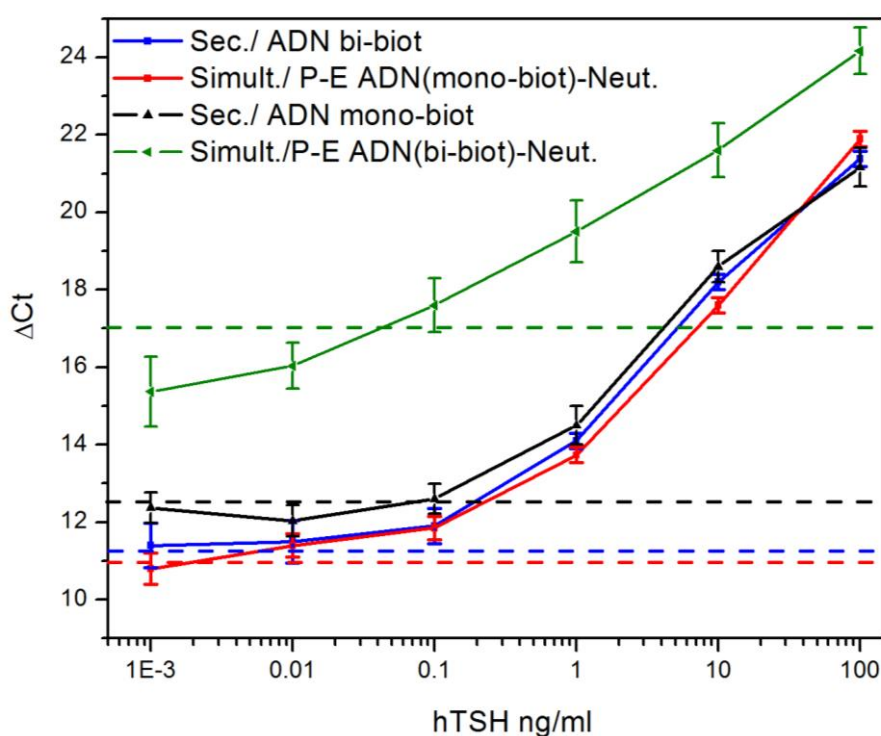


Figura 69: Evaluación de los esquemas operativos de IPCR para la detección de hTSH. Los ensayos se realizaron con la hormona diluida en PBS-L-T. Se grafica ΔC_t en el eje de ordenadas y las concentraciones de antígeno ($1,10^{-3}$ - 1 ng/ml) en el eje de abscisas. Se visualiza como líneas discontinuas se refiere a la media del control negativo ($\Delta C_t_{(NC)} + 3 DS$, para cada uno de los esquemas evaluados.

De las cuatro variantes estudiadas, los mejores resultados en términos de LD y dispersión entre réplicas, se obtuvieron con el esquema secuencial con ADN bi-biotinilado (Sec./ADN bi-biot) y con el esquema simultaneo con ADN mono-biotinilado [Simult./P-E ADN(mono-biot)-Neut.]. Se seleccionó este último para las siguientes etapas de desarrollo, dado que implica menor cantidad de etapas, y por ende menor tiempo total de duración del ensayo.

5.3.2. Pretratamiento de los tubos de PCR

Tradicionalmente los ensayos de ELISA se basan en la adsorción pasiva de anticuerpos o antígenos en los pocillos de una placa. Para facilitar la adsorción, las placas de ELISA se fabrican a partir de poliestireno que ha sido acondicionado para conferirle cierto grado de oxidación y facilitar la interacción entre las moléculas y la superficie de los pozos. Por el contrario, los tubos y placas para PCR no están diseñados para la adsorción de moléculas en fase sólida. A diferencia de las placas de ELISA, los materiales plásticos más utilizados para fabricar tubos o *strips* de PCR, son el polipropileno y el policarbonato, básicamente por sus características termoestables y termoconductoras. Estudios previos, realizados durante la tesina de grado y oportunamente publicados, nos permitieron establecer condiciones eficientes para la adsorción de anticuerpos en tubos de PCR convencionales, utilizando búferes con diferentes pH y/o fuerza iónica [113]. Con el fin de maximizar la capacidad de adsorción de MAbs de captura, evaluamos una estrategia frecuentemente reportada en la literatura y que es el pretratamiento de los tubos de PCR convencionales con glutaraldehído al 0,8%. Por ello, realizamos ensayos de ELISA *sandwich* (Figura 70, A y B) e IPCR *sandwich* (Figura 71, A y B) en tubos de PCR convencionales tratados con glutaraldehído al 0,8% V/V.

Contrariamente a lo esperado, el pretratamiento con glutaraldehído no proporcionó un incremento en la capacidad de detección. En la Figura 70-A se muestra una fotografía de tubos de PCR con y sin pretratamiento evaluados por ELISA *sandwich*. Cualitativamente se puede apreciar reacción positiva en los tubos sin pretratamiento para concentraciones del antígeno comprendidas entre 10 – 2,5 ng/ml. Por el contrario, no se observa reacción en los tubos expuestos al pretratamiento con glutaraldehído (Glut. 0,8%).

Una fracción del líquido de reacción de cada tubo se depositó en una placa de ELISA para su lectura en espectrofotómetro. En la Figura 71-B se muestra el gráfico obtenido de concentración del antígeno (TSH) versus las lecturas de absorbancia obtenidas para cada caso. ($\lambda = 450$ nm). Claramente los resultados muestran que el pretratamiento de los tubos afectó negativamente la detección del inmunocomplejo.

Para descartar una posible inhibición de la reacción colorimétrica, también se realizaron ensayos de IPCR en las mismas condiciones que las evaluadas por ELISA. Los resultados obtenidos fueron consecuentes con los obtenidos por ELISA (Figura 71, A y B).

Consideramos que ambos ensayos (ELISA e IPCR) utilizados para evaluar la utilidad del pretratamiento de los tubos de PCR para aumentar sus características adsorptivas, demuestran claramente que el tratamiento con glutaraldehído afectada negativamente la capacidad de detección. Los resultados nos permitieron descartar el pretratamiento de los tubos de PCR con glutaraldehído como condición óptima de adsorción de anticuerpos sobre la superficie de los mismos.

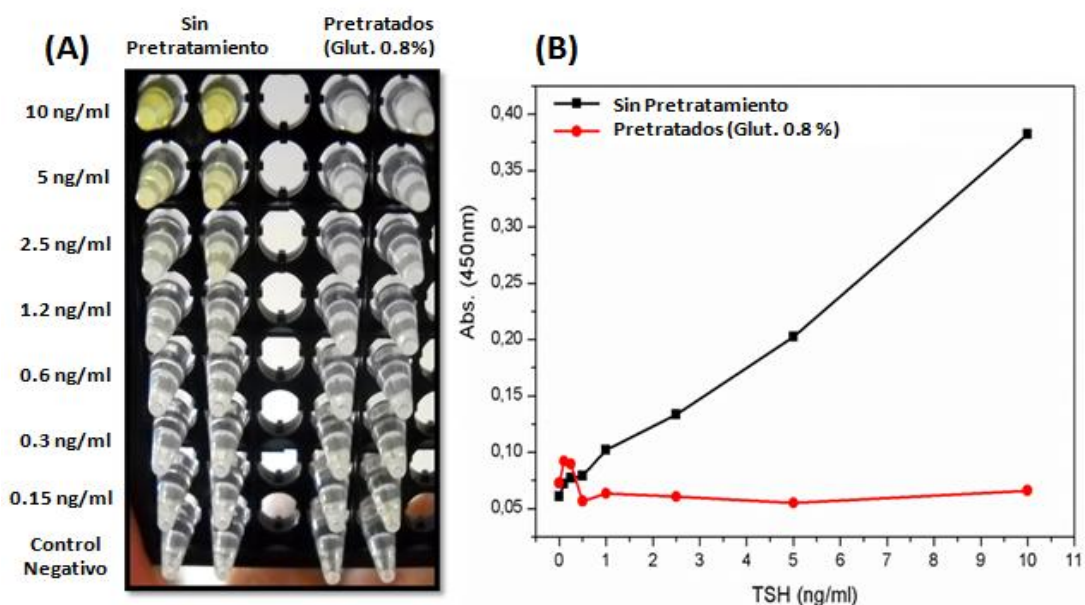


Figura 70: Evaluación de la adsorción del inmunocomplejo a la superficie de tubos de PCR estándar, con y sin pretratamiento con glutaraldehído. [A]: fotografía de tubos de PCR evaluados por ELISA sandwich [B]: gráfico de absorbancias (ordenada al origen) versus concentraciones de antígenos (10 - 0,15 ng/ml) en el eje de abscisas.

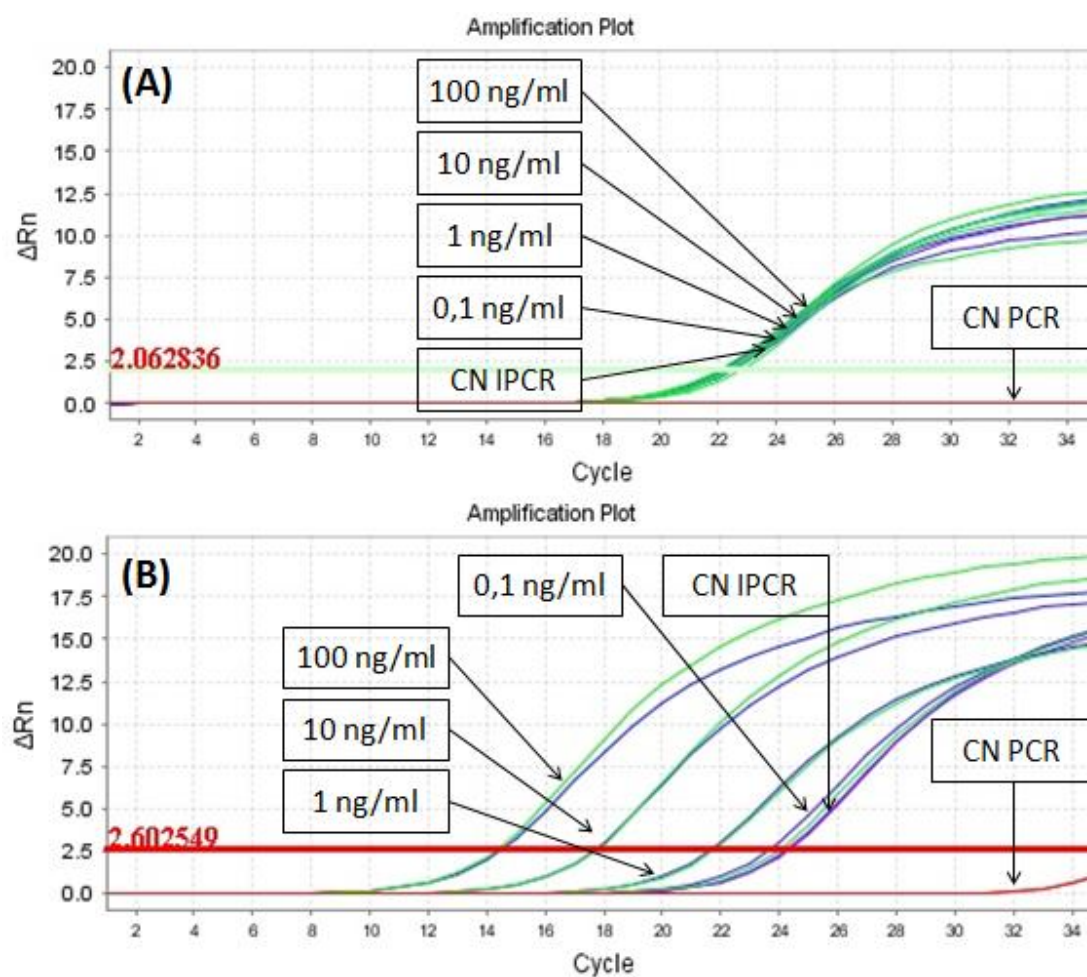


Figura 71: Evaluación de la adsorción del inmunocomplejo a la superficie de tubos de PCR estándar, con pretratamiento y sin. [A]: Curvas de amplificación en tiempo real obtenidas para la detección de hTSH (100 – 0,1 ng / ml) mediante IPCR sandwich en tubos de PCR estándar pretratados con glutaraldehído, 0,8%. [B]: Curvas de amplificación en tiempo real obtenidas para la detección de hTSH mediante IPCR sandwich en tubos de PCR estándar sin tratamiento previo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] LS Costanzo (2011a), Chapter 7 - Endocrine Physiology, En: *Physiology*, (Ed: C Taylor), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 222 - 232.
- [2] Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen, HM Kronenberg (2011a), Chapter 1 - Principles of Endocrinology, En: *Williams textbook of endocrinology*, (Ed: Pamela Hetherington, J Ryan), ELSEVIER, Saunders, Philadelphia, p. 3-12.
- [3] AC Guyton, JE Hall (2006a), Chapter 74 - Introduction to Endocrinology, En: *Textbook of medical physiology*, Elsevier, Saunders, Philadelphia, Pennsylvania., p. 905-917.
- [4] Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen, HM Kronenberg (2011b), Chapter 6 - Laboratory Techniques for Recognition of Endocrine Disorders, En: *Williams textbook of endocrinology*, (Ed: Pamela Hetherington, J Ryan), ELSEVIER, Saunders, Philadelphia, p. 83-99.
- [5] DU Silverthorn (2013a), Chapter 7 - Introduction to the Endocrine System, En: *Human Physiology: an integrated approach.*, (Ed: A Scanlan-Rohrer), Pearson Education, Inc., EE.UU, p. 206 - 228.
- [6] V Kumar, AK Abbas, JC Aster (2015), Capítulo 24 - Sistema Endocrino, En: *Robbins & Cotran Patología Estructural y Funcional*, (Ed: A Maitra), Elsevier, p. 1073 -1105.
- [7] DU Silverthorn (2013b), Chapter 23 - Endocrine Control of Growth and Metabolism, En: *Human Physiology: an integrated approach.*, (Ed: A Scanlan-Rohrer), Pearson Education, Inc., EE.UU, p. 775-800.
- [8] AC Guyton, JE Hall (2006b), Chapter 76 - Thyroid Metabolic Hormones, En: *Textbook of medical physiology*, Elsevier, Saunders, Philadelphia, Pennsylvania., p. 931-943.
- [9] R Rhoades, D Bell (2013a), Chapter 32 - Thyroid Gland, En: *Medical Physiology. Principles for Clinical Medicine.*, (Ed: K Horvath), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 621-632.
- [10] LS Constanzo (2011b), Chapter 9 - Fisiología endocrina, En: *Fisiología*, (Ed: X Gasull), Elsevier España, S.L., Barcelona (España), p. 379-442.
- [11] Shlomo Melmed, Kenneth S. Polonsky, P. Reed Larsen, HM Kronenberg (2011c), Chapter 11 - Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders, En: *Williams textbook of endocrinology*, (Ed: D Salvatore), ELSEVIER, Saunders, Philadelphia, p. 327-361.
- [12] AC Guyton, JE Hall (2006c), Chapter 74 - Endocrinology and Reproduction, En: *Textbook of medical physiology*, Elsevier, Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p. 905-916.
- [13] MI Chiamolera, FE Wondisford (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 150 (3):1091-1096.
- [14] R Rhoades, D Bell (2013b), Chapter 31 - Hypothalamus and the Pituitary Gland, En: *Medical Physiology. Principles for Clinical Medicine.*, (Ed: K Horvath), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 604-620.
- [15] Kaplan, A Lawrence, Pesce, J Amadeo (1990), *Química clínica: métodos*, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- [16] RS Yalow, SA Berson (1959) Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184 (Sup. 21): 1648-1649.

- [17] RM Lequin (2005) Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* 51 (12): 2415-2418.
- [18] A Voller, DE Bidwell, A Bartlett (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* 53 (1): 55-65.
- [19] JR Crowther (2001), *The ELISA guidebook.*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [20] C Brechot, F Degos, C Lugassy, V Thiers, S Zafrani, D Franco, H Bismuth, C Trepo, JP Benhamou, J Wands, et al. (1985) Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 312 (5): 270-276.
- [21] CM Niemeyer, M Adler, R Wacker (2007) Detecting antigens by quantitative immuno-PCR. *Nat Protoc* 2 (8): 1918-1930.
- [22] JS Rhee, BM Kim, CB Jeong, KM Leung, GS Park, JS Lee (2013) Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for glutathione S-transferase (GST-S) protein in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* and its application for environmental monitoring. *Chemosphere* 93 (10): 2458-2466.
- [23] DA Giljohann, CA Mirkin (2009) Drivers of biodiagnostic development. *Nature* 462 (7272): 461-464.
- [24] GT Stiernstedt, M Granstrom, B Hederstedt, B Skoldenberg (1985) Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 21 (5): 819-825.
- [25] DS Skelley, LP Brown, PK Besch (1973) Radioimmunoassay. *Clin Chem* 19 (2): 146-186.
- [26] C Greenwood, D Ruff, S Kirvell, G Johnson, HS Dhillon, SA Bustin (2015) Proximity assays for sensitive quantification of proteins. *Biomol Detect Quantif* 4: 10-16.
- [27] KP Janssen, K Knez, D Spasic, J Lammertyn (2013) Nucleic acids for ultra-sensitive protein detection. *Sensors (Basel)* 13 (1): 1353-1384.
- [28] KM Abu-Salah, MM Zourob, F Mouffouk, SA Alrokayan, MA Alaamery, AA Ansari (2015) DNA-Based Nanobiosensors as an Emerging Platform for Detection of Disease. *Sensors (Basel)* 15 (6): 14539-14568.
- [29] RK Saiki, S Scharf, F Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, N Arnheim (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-1354.
- [30] L Chang, J Li, L Wang (2016) Immuno-PCR: An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Anal Chim Acta* 910: 12-24.
- [31] T Sano, CL Smith, CR Cantor (1992) Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258 (5079): 120-122.
- [32] CM Niemeyer, M Adler, R Wacker (2005) Immuno-PCR: high sensitivity detection of proteins by nucleic acid amplification. *Trends Biotechnol* 23 (4): 208-216.
- [33] PC Weber, DH Ohlendorf, JJ Wendoloski, FR Salemme (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243 (4887): 85-88.
- [34] J Ren, L Ge, Y Li, J Bai, WC Liu, XM Si (2001) Detection of circulating CEA molecules in human sera and leukopheresis of peripheral blood stem cells with E. coli expressed bispecific CEAScFv-streptavidin fusion protein-based immuno-PCR technique. *Ann N Y Acad Sci* 945: 116-118.
- [35] V Ruzicka, W Marz, A Russ, W Gross (1993) Immuno-PCR with a commercially available avidin system. *Science* 260 (5108): 698-699.

- [36] H Zhou, RJ Fisher, TS Papas (1993) Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection. *Nucleic Acids Res* 21 (25): 6038-6039.
- [37] AH Khan, E Sadroddiny (2016) Application of immuno-PCR for the detection of early stage cancer. *Mol Cell Probes* 30 (2): 106-112.
- [38] J Barletta (2006) Applications of real-time immuno-polymerase chain reaction (rt-IPCR) for the rapid diagnoses of viral antigens and pathologic proteins. *Mol Aspects Med* 27 (2-3): 224-253.
- [39] PK Mehta, A Raj, NP Singh, GK Khuller (2014) Detection of potential microbial antigens by immuno-PCR (PCR-amplified immunoassay). *J Med Microbiol* 63 (Pt 5): 627-641.
- [40] M Spengler, M Adler, CM Niemeyer (2015) Highly sensitive ligand-binding assays in pre-clinical and clinical applications: immuno-PCR and other emerging techniques. *Analyst* 140 (18): 6175-6194.
- [41] ER Hendrickson, TM Truby, RD Joerger, WR Majarian, RC Ebersole (1995) High sensitivity multianalyte immunoassay using covalent DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 23 (3): 522-529.
- [42] K Sugawara, D Kobayashi, K Saito, D Furuya, H Araake, A Yagihashi, T Yajima, K Hosoda, T Kamimura, N Watanabe (2000) A highly sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for human angiotensinogen using the identical first and second polyclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 299 (1-2): 45-54.
- [43] H Liang, SE Cordova, TL Kieft, S Rogelj (2003) A highly sensitive immuno-PCR assay for detecting Group A Streptococcus. *J Immunol Methods* 279 (1-2): 101-110.
- [44] D Gaudet, D Nilsson, T Lohr, C Sheedy (2015) Development of a real-time immuno-PCR assay for the quantification of 17beta-estradiol in water. *J Environ Sci Health B* 50 (10): 683-690.
- [45] D Babu, PM Muriana (2011) Immunomagnetic bead-based recovery and real time quantitative PCR (RT iq-PCR) for sensitive quantification of aflatoxin B(1). *J Microbiol Methods* 86 (2): 188-194.
- [46] J Barletta, A Bartolome, NT Constantine (2009) Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion. *J Virol Methods* 157 (2): 122-132.
- [47] G Griffiths, B Nystrom, SB Sable, GK Khuller (2010) Nanobead-based interventions for the treatment and prevention of tuberculosis. *Nat Rev Microbiol* 8 (11): 827-834.
- [48] K Zhu, R Dietrich, A Didier, D Doyscher, E Martlbauer (2014) Recent developments in antibody-based assays for the detection of bacterial toxins. *Toxins* 6 (4): 1325-1348.
- [49] CM Niemeyer, M Adler, S Gao, L Chi (2001) Nanostructured dna-protein aggregates consisting of covalent oligonucleotide-streptavidin conjugates. *Bioconjug Chem* 12 (3): 364-371.
- [50] DY Ryazantsev, DV Voronina, SK Zavriev (2016) Immuno-PCR: Achievements and Perspectives. *Biochemistry (Mosc)* 81 (13): 1754-1770.
- [51] MJ Deng, XZ Xiao, YM Zhang, XH Wu, LH Zhu, XQ Xin, DL Wu (2011) A highly sensitive immuno-PCR assay for detection of H5N1 avian influenza virus. *Mol Biol Rep* 38 (3): 1941-1948.
- [52] BA Williams, JC Chaput (2010) Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates using a heterobifunctional crosslinker. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 4.41.
- [53] BM Zeglis, CB Davis, R Aggeler, HC Kang, A Chen, BJ Agnew, JS Lewis (2013) Enzyme-mediated methodology for the site-specific radiolabeling of antibodies based on catalyst-free click chemistry. *Bioconjug Chem* 24 (6): 1057-1067.
- [54] HT Le, JG Jang, JY Park, CW Lim, TW Kim (2013) Antibody functionalization with a dual reactive hydrazide/click crosslinker. *Anal Biochem* 435 (1): 68-73.

- [55] SA Kazane, D Sok, EH Cho, ML Uson, P Kuhn, PG Schultz, VV Smider (2012) Site-specific DNA-antibody conjugates for specific and sensitive immuno-PCR. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 109 (10): 3731-3736.
- [56] L Chen, H Wei, Y Guo, Z Cui, Z Zhang, XE Zhang (2009) Gold nanoparticle enhanced immuno-PCR for ultrasensitive detection of Hantaan virus nucleocapsid protein. *J Immunol Methods* 346 (1-2): 64-70.
- [57] J Guo, W Yang, C Wang (2013) Magnetic colloidal supraparticles: design, fabrication and biomedical applications. *Adv Mater* 25 (37): 5196-5214.
- [58] JW Perez, EA Vargis, PK Russ, FR Haselton, DW Wright (2011) Detection of respiratory syncytial virus using nanoparticle amplified immuno-polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 410 (1): 141-148.
- [59] JT Mason, L Xu, ZM Sheng, TJ O'Leary (2006) A liposome-PCR assay for the ultrasensitive detection of biological toxins. *Nat Biotechnol* 24 (5): 555-557.
- [60] J He, DL Evers, TJ O'Leary, JT Mason (2012) Immunoliposome-PCR: a generic ultrasensitive quantitative antigen detection system. *J Nanobiotechnology* 10 (1): 26.
- [61] M Adler, R Wacker, CM Niemeyer (2003) A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 308 (2): 240-250.
- [62] K Lind, M Kubista (2005) Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol Methods* 304 (1-2): 107-116.
- [63] N Malou, D Raoult (2011) Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies. *Trends Microbiol* 19 (6): 295-302.
- [64] M Adler, S Schulz, R Fischer, CM Niemeyer (2005) Detection of Rotavirus from stool samples using a standardized immuno-PCR ("Imperacer") method with end-point and real-time detection. *Biochem Biophys Res Commun* 333 (4): 1289-1294.
- [65] S Gofflot, MB El, D Zorzi, L Melen, S Roels, D Quatpers, J Grassi, E Vanopdenbosch, E Heinen, W Zorzi (2004) Immuno-quantitative polymerase chain reaction for detection and quantitation of prion protein. *J Immunoassay Immunochem* 25 (3): 241-258.
- [66] JM Barletta, DC Edelman, WE Highsmith, NT Constantine (2005) Detection of ultra-low levels of pathologic prion protein in scrapie infected hamster brain homogenates using real-time immuno-PCR. *J Virol Methods* 127 (2): 154-164.
- [67] W Zhang, M Bielaszewska, M Pulz, K Becker, AW Friedrich, H Karch, T Kuczius (2008) New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants. *J Clin Microbiol* 46 (4): 1292-1297.
- [68] L Potuckova, F Franko, M Bambouskova, P Draber (2011) Rapid and sensitive detection of cytokines using functionalized gold nanoparticle-based immuno-PCR, comparison with immuno-PCR and ELISA. *J Immunol Methods* 371 (1-2): 38-47.
- [69] Q Ye, H Zhuang, C Zhou (2009) Detection of naphthalene by real-time immuno-PCR using molecular beacon. *Mol Cell Probes* 23 (1): 29-34.
- [70] HS Zhuang, C Zhou (2009) Determination of anthracene by real-time immuno-polymerase chain reaction assay. *Anal Chim Acta* 633 (2): 278-282.
- [71] XY Meng, YS Li, Y Zhou, YY Zhang, B Qiao, Y Sun, L Yang, P Hu, SY Lu, HL Ren, JH Zhang, XR Wang, ZS Liu (2015) Real-time immuno-PCR for ultrasensitive detection of pyrene and other homologous PAHs. *Biosens Bioelectron* 70: 42-47.
- [72] M Spengler, M Adler, A Jonas, CM Niemeyer (2009) Immuno-PCR assays for immunogenicity testing. *Biochem Biophys Res Commun* 387 (2): 278-282.

- [73] G Kohler, C Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495-497.
- [74] JG Pierce, TF Parsons (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495.
- [75] C Cahoreau, D Klett, Y Combarnous (2015) Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors. *Front Endocrinol* 6: 6-26.
- [76] LE Reichert, Jr., B Dattatreymurthy, P Grasso, TA Santa-Coloma (1991) Structure--function relationships of the glycoprotein hormones and their receptors. *Trends Pharmacol Sci* 12 (5): 199-203.
- [77] JG Pierce (1971) Eli Lilly lecture. The subunits of pituitary thyrotropin--their relationship to other glycoprotein hormones. *Endocrinology* 89 (6): 1331-1344.
- [78] Y Combarnous (1988) Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Dev* 28 (2A):211-228.
- [79] RJ Ryan, MC Charlesworth, DJ McCormick, RP Milius, HT Keutmann (1988) The glycoprotein hormones: recent studies of structure-function relationships. *FASEB J* 2 (11): 2661-2669.
- [80] M Grossmann, BD Weintraub, MW Szkudlinski (1997) Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocr Rev* 18 (4): 476-501.
- [81] M Alevizaki, I Huhtaniemi (2002) Structure-function relationships of glycoprotein hormones; lessons from mutations and polymorphisms of the thyrotrophin and gonadotrophin subunit genes. *Hormones (Athens)* 1 (4): 224-232.
- [82] J Marchelidon, R Salesse, J Garnier, E Burzawa-Gerard, YA Fontaine (1979) Zoological origin of gonadotropin subunits and association kinetics. *Nature* 281 (5729): 314-315.
- [83] JC Pernollet, J Garnier, JG Pierce, R Salesse (1976) In vitro activation of glycoprotein hormones. Hybridization of subunits from thyrotropin, lutropin and human choriongonadotropin. *Biochim Biophys Acta* 446 (1): 262-276.
- [84] RJ Ryan, HT Keutmann, MC Charlesworth, DJ McCormick, RP Milius, FO Calvo, T Vutyavanich (1987) Structure-function relationships of gonadotropins. *Recent Prog Horm Res* 43: 383-429.
- [85] C Miller, A Ulloa-Aguirre, L Hyland, S Chappel (1983) Pituitary follicle-stimulating hormone heterogeneity: assessment of biologic activities of each follicle-stimulating hormone form. *Fertil Steril* 40 (2): 242-247.
- [86] PG Stanton, DM Robertson, PG Burgon, B Schmauk-White, MT Hearn (1992) Isolation and physicochemical characterization of human follicle-stimulating hormone isoforms. *Endocrinology* 130 (5): 2820-2832.
- [87] NR Thotakura, DL Blithe (1995) Glycoprotein hormones: glycobiology of gonadotrophins, thyrotrophin and free alpha subunit. *Glycobiology* 5 (1): 3-10.
- [88] JM Estrada, D Soldin, TM Buckey, KD Burman, OP Soldin (2014) Thyrotropin isoforms: implications for thyrotropin analysis and clinical practice. *Thyroid* 24 (3): 411-423.
- [89] G Galfre, C Milstein (1981) Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 73 (Pt B): 3-46.
- [90] RI Freshney (2005), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, John Wiley & Sons, New York, EE.UU.

- [91] CA Whitlock, CE Muller-Sieburg (1990) Long-Term B Lymphoid Cultures from Murine Bone Marrow : Establishment and Cloning by Using Stromal Cell Line AC 6.21. *Methods Mol Biol* 5: 303-322.
- [92] WM Yokoyama (2006), *Production of monoclonal antibodies*.
- [93] E Harlow, D Lane (1988), *Antibodies. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, United States.
- [94] JD Beatty, BG Beatty, WG Vlahos (1987) Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J Immunol Methods* 100 (1-2): 173-179.
- [95] JM Braun, J Charreire (1990) Production and characterisation of monoclonal antibodies directed against different epitopes of human thyroid stimulating hormone. *J Immunol Methods* 132 (2): 197-203.
- [96] M Benkirane, D Bon, F Bellot, P Prince, J Hassoun, P Carayon, P Delori (1987) Characterization of monoclonal antibodies against human thyrotropin and use in an immunoradiometric assay and immunohistochemistry. *J Immunol Methods* 98 (2): 173-181.
- [97] ID Hay, GG Klee (1993) Linking medical needs and performance goals: clinical and laboratory perspectives on thyroid disease. *Clin Chem* 39 (7): 1519-1524.
- [98] WE Winter, D Schatz, RL Bertholf (2015a), Chapter 42 -Thyroid Disorders, En: *Thyroid disorders. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, (Ed: BG Sawyer), Elsevier, Saunders, St. Louis, Missouri, p. 806-823.
- [99] DC Parker, AE Pekary, JM Hershman (1976) Effect of normal and reversed sleep-wake cycles upon nyctohemeral rhythmicity of plasma thyrotropin: evidence suggestive of an inhibitory influence in sleep. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 43 (2): 318-329.
- [100] R Osathanondh, IJ Chopra, D Tulchinsky (1978) Effects of dexamethasone on fetal and maternal thyroxine, triiodothyronine, reverse triiodothyronine, and thyrotropin levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 47 (6): 1236-1239.
- [101] WE Winter, D Schatz, RL Bertholf (2015b), Chapter 52 - Reference information for the clinical laboratory, En: *Thyroid disorders. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, (Ed: BG Sawyer), Elsevier, Saunders, St. Louis, Missouri, p. 951-994.
- [102] T Nareoja, JM Rosenholm, U Lamminmaki, PE Hanninen (2017) Super-sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for thyroid-stimulating hormone utilizing europium(III) nanoparticle labels achieved by protein corona stabilization, short binding time, and serum preprocessing. *Anal Bioanal Chem* 409 (13):3407-3416.
- [103] LM Demers, CA Spencer (2003) Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol* 58 (2): 138-140.
- [104] Domenico Salvatore, Terry F. Davies, Martin-Jean Schlumberger, Ian D. Hay, PR Larsen (2011),Chapter 11 - Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders, En: *Williams textbook of endocrinology*, (Ed: Pamela Hetherington, J Ryan), ELSEVIER, Saunders, Philadelphia, p. 327-361.
- [105] WD Odell, JF Wilber, WE Paul (1965) Radioimmunoassay of Human Thyrotropin in Serum. *Metabolism* 14: 465-467.
- [106] CA Spencer, JT Nicoloff (1980) Improved radioimmunoassay for human TSH. *Clin Chim Acta* 108 (3): 415-424.
- [107] E Engvall, P Perlmann (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8 (9): 871-874.

- [108] E Engvall, K Jonsson, P Perlmann (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* 251 (3): 427-434.
- [109] A Voller, A Bartlett, DE Bidwell (1978) Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* 31 (6): 507-520.
- [110] PA Masters, RJ Simons (1996) Clinical use of sensitive assays for thyroid-stimulating hormone. *J Gen Intern Med* 11 (2): 115-127.
- [111] IUPAC (2014) Compendium of Chemical Terminology. Gold Book. Version 2.3.3: p 839.
- [112] S Bonot, L Ogorzaly, B El Moualij, W Zorzi, HM Cauchie (2014) Detection of small amounts of human adenoviruses in stools: comparison of a new immuno real-time PCR assay with classical tools. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (12): 1010-1016.
- [113] J Abud, E Luque, J Ramos, H Rodriguez (2017) Production of monoclonal antibodies and development of a quantitative immuno-polymerase chain reaction assay to detect and quantify recombinant Glutathione S-transferase. *Protein Expr Purif* 135: 16-23.
- [114] M Adler, R Wacker, CM Niemeyer (2008) Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *Analyst* 133 (6): 702-718.
- [115] M Adler (2005) Immuno-PCR as a clinical laboratory tool. *Advances in clinical chemistry* 39: 239-292.
- [116] MC Hansen, L Nederby, MO Henriksen, M Hansen, CG Nyvold (2014) Sensitive ligand-based protein quantification using immuno-PCR: A critical review of single-probe and proximity ligation assays. *BioTechniques* 56 (5): 217-228.
- [117] R Kumar, RP Sinha (2014) Real-time immuno-PCR: an approach for detection of trace amounts of transgenic proteins. *J AOAC Int* 97 (6): 1634-1637.
- [118] X He, S Mc Mahon, TA Mc Keon, DL Brandon (2010) Development of a novel immuno-PCR assay for detection of ricin in ground beef, liquid chicken egg, and milk. *J Food Prot* 73 (4): 695-700.
- [119] RD Joerger, TM Truby, ER Hendrickson, RM Young, RC Ebersole (1995) Analyte detection with DNA-labeled antibodies and polymerase chain reaction. *Clin Chem* 41 (9): 1371-1377.
- [120] M Maia, H Takahashi, K Adler, RK Garlick, JR Wands (1995) Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen. *J Virol Methods* 52 (3): 273-286.
- [121] CM Niemeyer, M Adler, D Blohm (1997) Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates. *Anal Biochem* 246 (1): 140-145.
- [122] M Kubista, JM Andrade, M Bengtsson, A Forootan, J Jonak, K Lind, R Sindelka, R Sjoberg, B Sjogreen, L Strombom, A Stahlberg, N Zoric (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27 (2-3): 95-125.
- [123] CM Niemeyer, M Adler, B Pignataro, S Lenhert, S Gao, L Chi, H Fuchs, D Blohm (1999) Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR. *Nucleic Acids Res* 27 (23): 4553-4561.
- [124] CM Niemeyer (2000) Self-assembled nanostructures based on DNA: towards the development of nanobiotechnology. *Curr Opin Chem Biol* 4 (6): 609-618.
- [125] HL Pardue (1997) The inseparable triad: analytical sensitivity, measurement uncertainty, and quantitative resolution. *Clin Chem* 43 (10): 1831-1837.

- [126] L Bartalena, P Vitti, A Pinchera (1994) Diagnosis of thyroid dysfunction: present and future. *Nucl Med Biol* 21 (3): 531-544.
- [127] DD Jones, KE May, SA Geraci (2010) Subclinical thyroid disease. *Am J Med* 123 (6): 502-504.
- [128] AE Pekary, LF Turner, Jr., JM Hershman (1986) New immunoenzymatic assay for human thyrotropin compared with two radioimmunoassays. *Clin Chem* 32 (3): 511-514.
- [129] AE Pekary, JM Hershman (1986) Serum thyrotropin as measured with a one-step monoclonal-antibody radioimmunometric assay compared with two commercial radioimmunoassay kits. *Clin Chem* 32 (6): 1007-1009.
- [130] MR Hopton, JS Harrop (1986) Immunoradiometric assay of thyrotropin as a "first-line" thyroid-function test in the routine laboratory. *Clin Chem* 32 (4): 691-693.
- [131] Z Lin, X Wang, ZJ Li, SQ Ren, GN Chen, XT Ying, JM Lin (2008) Development of a sensitive, rapid, biotin-streptavidin based chemiluminescent enzyme immunoassay for human thyroid stimulating hormone. *Talanta* 75 (4): 965-972.
- [132] R Dittadi, S Rizzardi, S Masotti, C Prontera, A Ripoli, A Fortunato, A Alfano, C Carrozza, M Correale, G Gessoni, M Migliardi, G Zucchelli, A Clerico (2017) Multicenter evaluation of the new immunoassay method for TSH measurement using the automated Dxl platform. *Clin Chim Acta* 468: 105-110.
- [133] R Ekins, P Edwards (1997) On the meaning of "sensitivity". *Clinical chemistry* 43 (10):1824-1831.
- [134] D Rodbard (1978) Statistical estimation of the minimal detectable concentration ("sensitivity") for radioligand assays. *Analytical biochemistry* 90 (1): 1-12.
- [135] J Varayoud, L Monje, GS Moreno-Piovan, GH Galoppo, EH Luque, M Munoz-de-Toro, JG Ramos (2012) Sexually dimorphic expression of receptor- α in the cerebral cortex of neonatal Caiman latirostris (Crocodylia: Alligatoridae). *Gen Comp Endocrinol* 179 (2): 205-213.
- [136] FE Wondisford, S Radovick, JM Moates, SJ Usala, BD Weintraub (1988) Isolation and characterization of the human thyrotropin beta-subunit gene. Differences in gene structure and promoter function from murine species. *The Journal of biological chemistry* 263 (25): 12538-12542.
- [137] FE Wondisford, SJ Usala, GS DeCherney, M Castren, S Radovick, PW Gyves, JP Trempe, BP Kerfoot, VM Nikodem, BJ Carter, et al. (1988) Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol Endocrinol* 2 (1): 32-39.
- [138] JM Davis, JE Pennington, AM Kubler, JF Conscience (1982) A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods* 50 (2): 161-171.
- [139] JW Goding (1980) Antibody production by hybridomas. *J Immunol Methods* 39 (4): 285-308.
- [140] J Sharon, SL Morrison, EA Kabat (1979) Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (3): 1420-1424.
- [141] H Hjelm, K Hjelm, J Sjoquist (1972) Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS letters* 28 (1): 73-76.
- [142] R Lindmark, K Thoren-Tolling, J Sjoquist (1983) Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *Journal of immunological methods* 62 (1): 1-13.

- [143] MC Case, AD Burt, J Hughes, JM Palmer, JD Collier, MF Bassendine, SJ Yeaman, MA Hughes, GN Major (1999) Enhanced ultrasensitive detection of structurally diverse antigens using a single immuno-PCR assay protocol. *Journal of immunological methods* 223 (1): 93-106.
- [144] HS Zhuang, C Zhou (2009) Determination of anthracene by real-time immuno-polymerase chain reaction assay. *Analytica chimica acta* 633 (2): 278-282.
- [145] X Liu, Y Xu, YH Xiong, Z Tu, YP Li, ZY He, YL Qiu, JH Fu, SJ Gee, BD Hammock (2014) VHH phage-based competitive real-time immuno-polymerase chain reaction for ultrasensitive detection of ochratoxin A in cereal. *Analytical chemistry* 86 (15): 7471-7477.